Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. J. Mallach

Über geeignete mikrochemische Nachweismethoden von Chlordiazepoxid (Librium®) und seinen Metaboliten als Voraussetzung für pharmakokinetische Untersuchungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Siegfried Henzler
aus Tübingen

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0078

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. J. Mallach

Über geeignete mikrochemische Nachweismethoden von Chlordiazepoxid (Librium®) und seinen Metaboliten als Voraussetzung für pharmakokinetische Untersuchungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Siegfried Henzler
aus Tübingen

1970

Dekan: Professor Dr. med. K. Mörike

Berichterstatter: Professor Dr. med. H. J. Mallach

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. H. J. Mallach, Direktor des Instituts für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen, für die Überlassung des Themas sowie die fachlichen Ratschläge bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Dipl. Chem. K. Besserer danke ich für die zahlreichen Anregungen bei der Einarbeitung in die chemisch-toxikologische Arbeitstechnik.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. med. H.-J. Mittmeyer für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG

A. Die Bedeutung der Benzodiazepine in der forensisch-toxikologischen Praxis und Zielsetzung der Arbeit 1

B. Pharmakodynamische und pharmakologische Eigenschaften, klinische Anwendungsbereiche, Verträglichkeit und Metabolismus von Chlordiazepoxid 5

C. Bekannte Nachweismethoden von Chlordiazepoxid 9

II. METHODIK

A. Chemische und physikalische Daten von Chlordiazepoxid und 2-Amino-5-chlorbenzophenon 13

1. Löslichkeit 14
2. Verhalten gegen Säuren 14
3. Schmelzpunktbestimmung 15
4. IR-Spektren 15
5. Lichtabsorption im Ultraviolett 16
   a) Messung im neutralen Bereich 16
   b) Messung im alkalischen Bereich 16
   c) Messung im sauren Bereich 19
6. BRATTON-MARSHALL-Reaktion 19
7. Chromatographisches Verhalten
   a) Papierchromatographie 20
   b) Dünnschichtchromatographie 20
8. Nachweisbarkeitsgrenzen
   a) Papierchromatographie 24
   b) Dünnschichtschromatographie 26

Seite

9. Mikrokristallographie 27

B. Vorversuche

1. Hydrolyse-Versuche 28
2. Extraktionsversuche mit und ohne Eiweißfällung 29
3. Extraktionsversuche mit Chloroform 29
4. Säulenchromatographisches Verfahren zur Isolierung von 2-Amino-5-chlorbenzophenon aus Serum 30
5. Dünnschichtchromatographisches Verfahren
   a) Zur Isolierung von Chlordiazepoxid aus Serum 31
   b) Zur Isolierung von 2-Amino-5-chlorbenzophenon aus Serum 32

C. Statistische Formeln 33

D. Analytik

Aufstellung von Eichkurven

a) Standardlösungen der Reinsubstanzen 35
   aa) Chlordiazepoxid 35
   ab) 2-Amino-5-chlorbenzophenon 40
b) Extraktionsversuche 48
   ba) Zusatzversuche mit Chlordiazepoxid-Reinsubstanz zu Rinderserum (Reextraktionsmethode) 48
   bb) Zusatzversuche mit 2-Amino-5-chlorbenzophenon zu Rinderserum (Diazotierungsmethode) 53

E. Pharmakokinetik

Verlauf der Blutserumkonzentration von Chlordiazepoxid nach Einnahme verschieden hoher Dosen von Chlordiazepoxid-Base 59

Seite

1. Versuchsmodell 59
a) 1. Hauptversuch 59
b) 2. Hauptversuch 60
c) 3. Hauptversuch 60
2. Auswertung der Seren 60
a) Methode I: Serumspiegel von Chlordiazepoxid-Reinsubstanz (Reextraktionsmethode) 60
aa) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zur Identifizierung 61
b) Methode II: Bestimmung von unverändertem Chlordiazepoxid und ätherlöslichen Metaboliten nach der Diazotierungsmethode von BRATTON und MARSHALL 68
c) Methode III: Bestimmung von Chlordiazepoxid-Reinsubstanz über Säure-Reextraktion, Hydrolyse und Diazotierung nach BRATTON und MARSHALL 70
d) Aussage über das Ausmaß vorhandener Metaboliten von Chlordiazepoxid 73

III. DISKUSSION 75

IV. ZUSAMMENFASSUNG 86

V. LITERATURVERZEICHNIS 88

I. EINLEITUNG

A. Die Bedeutung der Benzodiazepine in der forensisch-toxikologischen Praxis und Zielsetzung der Arbeit

Zu der großen Gruppe der Tranquilizer, Ataractika oder minor tranquilizers, wie sie im angelsächsischen Sprachgebrauch auch genannt werden, kam 1960 als erstes Präparat der Benzodiazepine oder Benzoxadiazepine Chlordiazepoxid oder Methaminoxid (Librium ^{R}) hinzu, das mit den bisher gebräuchlichen Ataractika in chemisch-struktureller Hinsicht nicht zu vergleichen war. Die Synthese - ausgehend vom 2-Amino-5-chlorbenzophenon - wurde in den Laboratorien der HOFFMANN-LA ROCHE, Inc., Nutley, USA (Versuchsbezeichnung Ro 5 - 0690) von STERNBACH und REEDER entwickelt (Siehe Abbildung 1). Inzwischen wurden von STERNBACH und seinen Mitarbeitern weitere 5-Phenyl-1,4-benzodiazepine synthetisiert, die hier kurz zusammengestellt werden sollen:

I.N.N.	Handelsname	Firma
Diazepam	Valium	Hoffmann-La Roche
Nitrazepam	Mogadan	Hoffmann-La Roche
Oxazepam	Adumbran	Dr. K. Thomae
Medazepam	Nobrium	Hoffmann-La Roche

Das neueste Benzodiazepinderivat, das sich zur Zeit noch in klinischer Prüfung befindet, ist das von den Clin-Byla-Laboratorien in Paris hergestellte Dikalium-chlorazepat oder Tranxène. In Deutschland wird es unter der Bezeichnung Tranxilium (TR 19119) von der Firma Heinrich Mack (Nachf.) vertrieben (BRUNAUD und Mitarbeiter, 1970).

Gemeinsam ist ihnen die 1,4-Diazepin-Konfigurierung, also ein 7-Ring-System mit 2 N-Atomen in 1,4-Stellung.

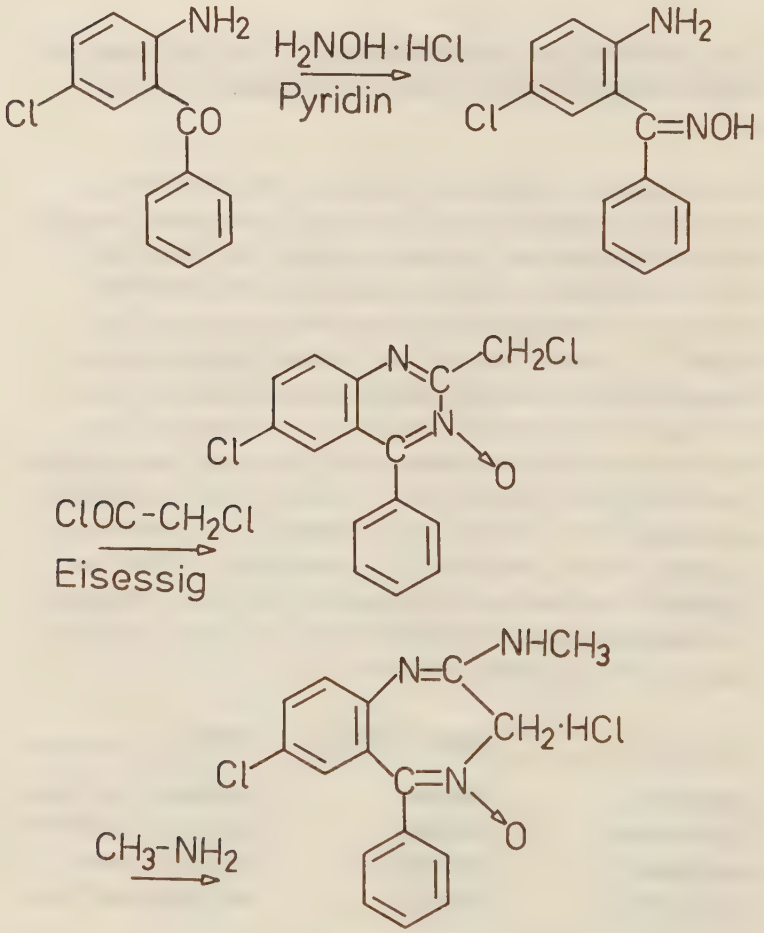


Abb. 1: Synthese von 7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxyd.

Librium selbst ist als Chlorhydrat in Librium-10-Kapseln,

als Base in Librium-5- und Librium-25-Roche-Dragees im Handel. Als Kombinationspräparate liegen außerdem vor: Librax ^{R}, Pentrium ^{R} und Limbadril ^{R}. Vom VEB Arzneimittelwerk Dresden wurde seit Mai 1967 Chlordiazepoxid unter dem Namen Timosin in den Handel gebracht.

Der ständig wachsende Verbrauch, die vielfach ärztlich unbegründete und zu voreilige Verordnung sowie die indikations- und kritiklose Einnahme, die den Tranquilizern Namen wie happy pills, pilules de bonheur, peace-of-mind pills usw. eingebracht hatten (WANDREY und LEUTNER, 1967), führten dazu, daß in der gutachterlichen Praxis des Verkehrs- und Gerichtsmediziners die Frage nach der Beeinträchtigung sowohl der Fahrtüchtigkeit als auch der strafrechtlichen Verantwortlichkeit durch Arzneimittel und speziell das Problem der Wechselwirkung zwischen verschiedenen Pharmaka und Alkohol zunehmend häufiger gestellt wurde (HÄNDEL, 1964).

In einer Stellungnahme der Deutschen Bundesärztekammer zur Einschränkung der Verkehrstauglichkeit vom 10.1.1964 fielen auch die Benzodiazepine unter die Arzneimittel, nach deren Einnahme möglichst kein Fahrzeug geführt werden sollte. WAGNER (1963) wies in einer Untersuchung von 5000 Kraftfahrern, die einen Unfall verursacht hatten, bei 10 bis 12 % innerhalb der letzten 24 Stunden vor dem Unfallereignis Medikamenteneinnahme nach. MALLACH (1968) fand in einer Untersuchung von 1960 - 1966 bei 4.3 % alkoholbeeinflußter Verkehrsdelinquenten gleichzeitige Einnahme von Arzneimitteln. Nach KIELHOLZ und Mitarbeitern (1967) ist es möglich, daß durch Psychopharmaka die perzeptiven Fähigkeiten, die intellektuellen und affektiven Funktionen sowie auch die motorischen Leistungen beeinträchtigt werden können.

EEROLA und ALHA (1963) wiesen daraufhin, daß klinische und experimentelle Beobachtungen sowie die gerichtsärztlichen Fälle gezeigt hätten, daß eine synergetische Wirkung von Alkohol und Beruhigungsmitteln bestünde; einen potenzierenden Effekt hielten sie für noch nicht bewiesen, jedoch erschien es ihnen für wichtig, die additive Wirkung des Alkohols nach vorangehendem Genuß von Beruhigungsmitteln zu berücksichtigen. Im pharmakologischen Experiment gelang es ETZLER, HÖHNLE, JOSWIG, KÖHLER und MALLACH (1969) nachzuweisen, daß durch Nitrazepam zum Beispiel die Alkoholwirkung verstärkt, andererseits durch Carbamazepin abgeschwächt wurde. KOPMANN und HUGHES (1959) beobachteten an Ratten, daß Alkohol und Meprobamat sich gegenseitig potenzierten, das heißt nach Einnahme beider Mittel trat eine überadditive Wirkungsverstärkung auf. Eine Wirkungsabnahme, das heißt ein negativer Synergismus der Wirkung zweier Stoffe, konnte am Beispiel Alkohol/Isoniazid in Tierversuchen nachgewiesen werden. So konnten GLASS, GOSSOW und MALLACH (1964) zeigen, daß bei gleichzeitiger Verabfolgung beider Stoffe kleine Alkoholdosen die Wirkung großer Isoniaziddosen, bei denen 50 % aller Tiere sterben sollten, aufheben. KIELHOLZ und Mitarbeiter konnten nach Gabe kleiner Dosen von Chlordiazepoxid und Alkohol keine Wirkungsverstärkung feststellen. Nach MALLACH (1969) stand dies wiederum im Gegensatz zu Angaben anderer Autoren. So beobachtete PRIBILLA (1964) im Rahmen von Begutachtungsfällen eine stärkere Potenzierung der Chlordiazepoxidwirkung durch Alkohol, die teilweise bis zu Dämmerzuständen mit vollständiger retrograder Amnesie führte. Diesen Widerspruch erklärte MALLACH dadurch, daß für das Maß einer bestimmten Wechselwirkung die Höhen der Dosen, die miteinander kombiniert werden, von entscheidender Wichtigkeit seien; ferner käme es darauf an, ob beide Stoffe gleichzeitig oder nach Einschaltung eines Zuführungsintervalles, und außerdem in welcher Reihenfolge die Wirkstoffe in Wechselwirkung treten.

Zur wissenschaftlichen Auseinandersetzung des Problems Alkohol und Arzneimittel forderte MALLACH (1968):

1. Die Entwicklung hochempfindlicher chemisch-analytischer Methoden zur Prüfung der Pharmakokinetik
2. Die Entwicklung mathematisch-statistischer Modelle zur Prüfung der Wechselwirkung zwischen zwei und mehreren Stoffen.

Als Beitrag zu der ersten Forderung soll die Aufgabe der vorgelegten Arbeit eine Darstellung und Prüfung bisher bekannter Mikro-Methoden zum Nachweis von Chlordiazepoxid im Blutserum sein; weitere Aufgabe war deren Weiterentwicklung und die Untersuchung von Blutspiegelbewegungen nach einmaliger Gabe unterschiedlich hoher Dosen von Chlordiazepoxid.

B. Pharmakodynamische und pharmakologische Eigenschaften, klinische Anwendungsbereiche, Verträglichkeit und Metabolismus von Librium.

Chlordiazepoxid zeigt eine auffallend zähmende Wirkung (taming effect), wie RANDALL und Mitarbeiter (1960) an angriffslustigen und bösartigen Tieren (Ratten mit operativ gesetzten Septumdefekten) zeigen konnten. Im Elektroschock wurde ein hoher antikonvulsiver Effekt nachgewiesen. An weiteren Eigenschaften wurden muskelrelaxierende, angstlösende, sedierende und appetitanregende Wirkungen beschrieben. Bei höherer Dosierung konnte Ataxie sowie eine geringe Wirkung auf Kreislauf und Herzrhythmus im Sinne einer Blutdrucksenkung und Verlangsamung der Herzfrequenz (RANDALL, 1960, 1961; RANDALL und Mitarbeiter, 1960, 1961, 1962; STERNBACH, 1961; TOBIN, 1960; LIBERSON, 1961) beobachtet werden. BÄUMLER und RIPPSTEIN (1961) beschrieben im weiteren eine

antidepressive, leicht stimmungshebende Wirkung. Der tranquilisierende Effekt von Chlordiazepoxid ist nicht von Müdigkeit oder Schlaf begleitet (Ataraxia = Seelenruhe); das heißt es besteht eine große Spanne zwischen entspannender und hypnotischer Wirkung (WANDREY und LEUTNER, 1967; DEGKWITZ, 1967). Das limbische System, das als morphologisches Substrat für das Affektverhalten und die vegetativen Organfunktionen anzusehen ist und deshalb auch als visceral brain bezeichnet wird (WANDREY und LEUTNER, 1967; LEUBE, 1969), erfährt durch die Benzodiazepine eine selektive Beeinflussung im Sinne einer Dämpfung, und zwar bereits in Dosen, die andere Hirnareale in ihrer elektrophysiologischen Aktivität noch nicht ändern (SCHALLEK und KUEHN, 1960). Tranquilizer der Benzodiazepin-Reihe werden daher auch als limbische Blocker bezeichnet. Aufgrund dieser selektiven Dämpfung besitzen sie einen schlafinduzierenden Effekt, also eine bahnende und regulierende Wirkung auf den physiologischen Schlafrhythmus durch Abschirmung natürlicher Einschlafmechanismen gegen erregende Reize aus anderen Bereichen. MUNOZ (1964) prägte daher für sie den Begriff Euhypnica.

Chlordiazepoxid zeigt eine ausgesprochen geringe Toxizität und damit eine große therapeutische Breite, wie Erfahrungen mit sehr hohen Einzeldosen oder Intoxikationen in suizidaler Absicht gezeigt haben (WYSS und MAIER, 1960). Im Tierexperiment wirkten erst 720 mg/kg Maus per os unter dem Bild der Atemlähmung letal (gegenüber 263 für Phenobarbital). An Ratten betrug die LD_{50} etwa 2000 mg/kg (PRIBILLA, 1964).

COHEN (1969) wies daraufhin, daß selbst nach jahrelanger hoher Dosierung Chromosomenschäden durch Chlordiazepoxid und Diazepam nicht nachgewiesen werden konnten. BORIS und Mitarbeiter (1961) fanden keine gegenteiligen Auswirkungen auf das endokrine System.

BURGER (1962) stellte in einer Untersuchung am Menschen fest, daß nach Gaben von 1.5 mg/kg Chlordiazepoxid deutliche Ausfallserscheinungen wie ataktischer Gang, unkoordinierte Bewegungen und Schläfrigkeit auftraten. Im Doppelblindversuch nach dreitägiger Gabe von 3 x 10 mg Chlordiazepoxid konnten DITT und PAUER (1965) eine deutliche Abschwächung der Konzentrationsfähigkeit, ataktische Fehlleistungen, eine Verschlechterung der Reaktionsfähigkeit sowie eine deutliche Störung des optokinetischen Nystagmus und eine Verzögerung der Auffassungsfähigkeit nachweisen. Im Gegensatz dazu fanden KIELHOLZ und Mitarbeiter (1967) keine statistisch signifikante Beeinträchtigung der Fahrtüchtigkeit nach einmaliger Gabe von 10 mg Chlordiazepoxid.

Librium ^{R} findet heutzutage Anwendung in beinahe allen Bereichen der Medizin, da es Angst- und Spannungszustände beseitigt oder zumindest mildert, die Erwartungsangst nimmt und durch Dämpfung überschießender vegetativer Reaktionen zu einer Aequilibrierung der Körperfunktionen führt (PIRA, 1961). Selbst bei rein somatischen Krankheitsbildern wie dem degenerativen Rheumatismus mit sekundären Muskelspasmen kann es durch seine relaxierende Wirkung nützliche Hilfe leisten (PIRA, 1961; VON RECHENBERG und SPIEGELBERG, 1960; HARRIS, 1960; GARRONE und DICK, 1960; JÜNEMANN und Mitarbeiter, 1961; KIELHOLZ, 1960; SPARWASSER, 1962; TAUBER, 1960; WALSEN, 1961; WREDE, 1961). Eine Untersuchung von REIMER (1968) zeigt das Wirkungsprofil von Chlordiazepoxid im Vergleich zu anderen Benzodiazepinderivaten (Tabelle 1).

Über Metabolismus und Ausscheidung von Chlordiazepoxid haben PRIBILLA (1964); RANDALL, SCHECKEL und BANZIGER (1965); KOECHLIN und SCHWARTZ (1961) berichtet. Versuche

Wirkungs-qualität	Chlordiaz-epoxid (Librium)	Diazepam (Valium)	Nitrazepam (Mogadan)	Medazepam (Nobrium)
angstlösend	+++	++	+	+++
sedierend	++	+++	+++	+
schlafan-stoßend	++	+++	+++	++
muskelre-laxierend	+	+++	+	+
antiepi-leptisch	+	+++	+++	+

Tabelle 1: Vergleich der Wirkungsqualitäten verschiedener Benzodiazepine.

mit in Stellung 2 durch C^{14} markiertem Chlordiazepoxid zeigten eine schnelle Resorption sowohl im Tierversuch (Ratte, Hund) als auch beim Menschen. Sie erfolgte erst im Dünndarm, wie sich durch Versuche an Ratten mit pylorusligiertem Magen zeigen ließ. 45 % der C^{14}-Aktivität ließen sich nach einmaliger Dosis im Harn nachweisen. Eine größere Menge erschien in den Faeces, während in der Atemluft keine Aktivität nachweisbar war. Ausscheidungsversuche zeigten, daß nur 1 - 2 % der zugeführten Dosis als freies Chlordiazepoxid im Harn erschienen und 3 - 6 % als an Glucuronsäure gekoppeltes Chloridazepoxid. Die Substanz wird demnach fast vollständig metabolisiert. KOECHLIN und SCHWARTZ (1961) wie auch RANDALL und Mitarbeiter (1965) konnten im Blutplasma des Menschen eine Halbwertszeit von 22 bis 24 Stunden, des Hundes von 10 bis 14 Stunden und der Ratte von 4 bis 6 Stunden feststellen. Daraus wurde gefolgert, daß im Gegensatz zum Tierversuch beim Menschen offenbar

eine Speicherung eintritt. Bei Ratten konnte gezeigt werden, daß die Konzentration an Chlordiazepoxid im Hirn etwa der im Plasma gleich ist, während in Leber, Niere, Herz und Milz sowie im Fettgewebe höhere Werte gefunden wurden. Der Gehalt in der Muskulatur war dagegen deutlich niedriger. Im Harn zeigte die C^{14}-Ausscheidung eine Halbwertszeit von 70 Stunden. Es konnten im Verlauf von 2 Wochen 60 % der zugeführten Aktivität im Harn wiedergefunden werden. 20 % waren während der ersten 10 Tage in den Faeces aufgefunden worden.

Während die Ratte hauptsächlich alkalische Metaboliten im Harn aufweist, finden sich bei Mensch und Hund vorwiegend saure Metaboliten. Bei Letzterem wird der Methylaminosubstituent an C_2 durch eine Ketogruppe ersetzt. Dadurch entsteht das Lactam (Ro-5-2092), das ebenso wie das Chlordiazepoxid pharmakologisch aktiv ist (RANDALL und Mitarbeiter, 1965). Hierdurch ist bewiesen, daß für die pharmakologische Wirksamkeit die Methylaminogruppierung nicht notwendig ist. Der Siebenring im Lactam wird schließlich durch hydrolytische Spaltung geöffnet, so daß das sogenannte offene Lactam entsteht, welches nun pharmakologisch wirkungslos ist (Siehe Abbildung 2).

Die beiden in Abbildung 2 dargestellten Metaboliten konnten im Urin gefunden werden. PRIBILLA (1964) gab in einer Zusammenstellung insgesamt 5 mögliche Stoffwechselprodukte an, wies aber daraufhin, daß noch weitere Versuche zur Isolierung und Identifizierung der Abbauprodukte vorgenommen werden müssen.

C. Bekannte Nachweismethoden von Librium

BÄUMLER und RIPPSTEIN (1961) beschrieben ein dünnschichtchromatographisches Verfahren, das es erlaubt, Chlor-

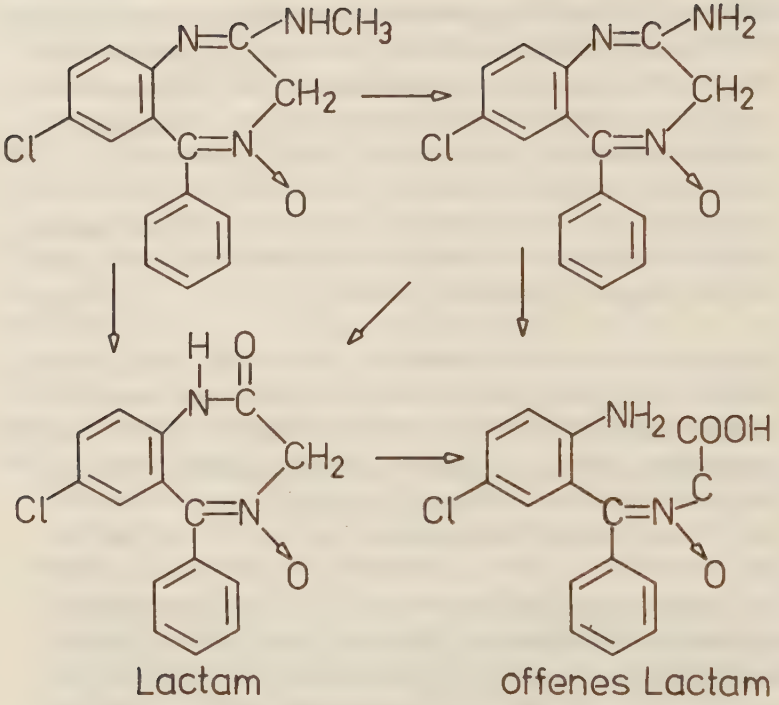


Abb. 2: Die wichtigsten Metabolisierungsschritte von Chlordiazepoxid bei Mensch und Hund (nach PLETSCHER und Mitarbeiter, 1966).

diazepoxid - selbst nach einmaliger Einnahme einer Dosis von nur 10 mg - qualitativ nachzuweisen. Dabei gingen sie von der Eigenschaft der Verbindung aus, in der Hitze bei stark saurem Milieu quantitativ in das 2-Amino-5-chlorbenzophenon durch Spaltung des Siebenringes an den beiden -N=C-Bindungen überzugehen. Zur Sichtbarmachung auf der Dünnschichtplatte diente die Diazotierung mit Nitritlösung und Kupplung mit ß-Naphthol in alkalischer Lösung.

Als Weiterentwicklung dieser Methode ist das von KAMM und BAIER (1969) angegebene Verfahren zum Nachweis von Chlordiazepoxid in kleinen Blutmengen anzusehen. Als Kupplungskomponente dient hier jedoch das noch empfindlichere N-(1-Naphthyl)-Äthylendiamindihydrochlorid. Durch einen Vergleich der Fleckengröße des nach Säurehydrolyse entstehenden und angefärbten Aminobenzophenons auf dem Dünnschichtchromatogramm ist hierbei eine grobquantitative Aussage möglich.

KAMM und KELM (1969) beschreiben ein Verfahren zum quantitativen Nachweis von Oxazepam. Da auch bei dieser Methode der Nachweis über die Hydrolyse zum 2-Amino-5-chlorbenzophenon - also demselben Hydrolyseprodukt wie bei Chlordiazepoxid - erfolgt, kann es auch zur quantitativen Bestimmung des letzteren angewendet werden. Dabei erfolgt die Diazotierung auf einer präparativen Dünnschichtplatte. Die gefärbten Zonen werden anschließend abgeschabt und mit einer gemessenen Menge eines Solvens eluiert. Das Eluat kann dann gegen das reine Lösungsmittel photometrisch gemessen werden.

Ein polarographisches Verfahren zum quantitativen Nachweis von Chlordiazepoxid wurde von OELSCHLÄGER (1963) beschrieben. Die Möglichkeit zur polarographischen Analyse bieten die Aminoxidgruppe und eine oder beide C=N-Doppelbindungen. Es handelt sich also dabei um einen Nachweis, der enger an die Molekülstruktur gebunden ist als dünnschichtchromatographische Tests.

Gaschromatographische Nachweisverfahren wurden von KAZYAK und KNOBLOCK (1963), de SILVA und Mitarbeitern (1964), VIGNOLI und CANO (1966) sowie von THOMSON und DECKER (1968) entwickelt. Bei KAZYAK und KNOBLOCK dient 3 % QF-1-0065 (FS 1265) Fluorosiloxan als Säulenfüllmaterial und als Detektor ein Argon-ß-Ionisations-Detektor.

Von de SILVA werden als Nachweisgrenze der gaschromatographischen Bestimmung 0.1 bis 0.2 gamma/ml angegeben.

Von KOECHLIN und D'ARCONTE (1963) wurde eine empfindliche spektrofluorometrische Methode entwickelt. Dabei wird die extrahierte Reinsubstanz durch milde Hydrolyse in das Lactam überführt, das unter Lichteinfluß in alkalischem Milieu eine charakteristische Fluoreszenz aussendet, über die es quantitativ bestimmt werden kann. Die Empfindlichkeit dieser Methode beträgt etwa 0.25 gamma/ml. Bei Versuchen mit einer einmaligen Dosis von 30 mg Chlordiazepoxid, die sie drei verschiedenen Versuchspersonen gaben, erhielten die Autoren die höchsten Plasmaspiegel 2 bis 4 Stunden nach Applikation (Blutentnahmen nach 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden), und zwar in einer Höhe von 1.3 - 2 gamma/ml. Die Halbwertszeit des unveränderten Chlordiazepoxids im Plasma betrug nach ihren Bestimmungen 20 bis 24 Stunden. In einem zweiten Versuch sollte lediglich das Lactam, als einer der wichtigsten Metaboliten, nachgewiesen werden. Meßbare Konzentrationen fanden sich jedoch nicht. Im Fall einer accidentellen Überdosierung von 500 mg Librium gelang es, eine maximale Chlordiazepoxid-Konzentration von 25.3 gamma/ml und eine maximale Lactam-Konzentration von 2.05 gamma/ml nachzuweisen. Daraus schlossen die Autoren, daß bei therapeutischen Dosen die Konzentration des Metaboliten unter der Nachweisgrenze ihrer Methode liegen müsse.

In Versuchen von SMYTH und PENNINGTON (1963), die nur unverändertes - und angeblich kein metabolisiertes - Chlordiazepoxid über Säure-Reextraktion des eingeengten Chloroformextraktes aus dem alkalisch gemachten Blutserum und anschließendem Diazotierungsvorgang fanden, wurden folgende Ergebnisse erzielt: 9 Versuchspersonen wurde die einmalige Dosis von 100 mg Wirkstoff verab-

reicht. Nach 3 Stunden wurde die höchste mittlere Konzentration mit 5 gamma/ml erreicht und anschließend ein flacher Konzentrationsabfall beobachtet. Bestimmungen 24, 48 und 72 Stunden nach der Einnahme ergaben noch mittlere Konzentrationen von 2.33, 0.91 und 0.52 gamma/ml Blutserum. Der entsprechende Nachweis im Urin erbrachte, daß im gesamten Urin von 48 Stunden nur etwa 0.8 % der ursprünglich verabreichten Dosis gefunden werden konnte.

Allgemein ist zu den Nachweismethoden noch zu sagen, daß mit der qualitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid in unveränderter Form oder über das 2-Amino-5-chlorbenzophenon aus biologischem Material die Spezifität der sehr empfindlichen dünnschichtchromatographischen Reaktionen, auch bei Mitlaufen von Kontrollsubstanzen, gemindert wird. So kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß körpereigene Verbindungen physiologischer oder pathologischer Natur annähernd gleiche Rf-Werte und ähnliche Färbungen ergeben wie Chlordiazepoxid oder sein Hydrolyseprodukt; Täuschungen liegen daher im Bereich des Möglichen. Es sollte daher immer im Interesse eines sicheren Befundes eine spektralphotometrische Untersuchung angeschlossen werden (OELSCHLÄGER, 1963).

II. METHODIK

A. Chemische und physikalische Daten von Chlordiazepoxid und 2-Amino-5-chlorbenzophenon

Chlordiazepoxid

Chemischer Name: 7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3-H-1,4-benzodiazepin-4-oxid

Strukturformel: Siehe Abb. 1, 2

Summenformel: $C_{16}H_{14}ClN_3O$

Molekulargewicht: Base 299,8
Hydrochlorid 336,2

Farbloses, kristallines Pulver.

Das Hydrochlorid hat einen stark bitteren Geschmack und einen unscharfen Schmelzpunkt von 215 - 216°C (PRIBILLA, 1964; BEYER und SADEE, 1969a). In wäßrigen Lösungen und unter Lichteinfluß ist Chlordiazepoxid instabil. Dabei entsteht das gelb gefärbte Hydrolyseprodukt 2-Amino-5-chlorbenzophenon (BÄUMLER und RIPPSTEIN, 1961).

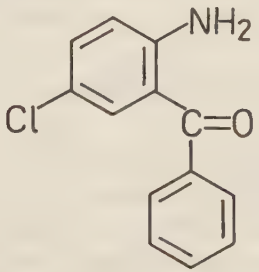
1. Löslichkeit

Die Base ist löslich in organischen Lösungsmitteln und verdünnten Mineralsäuren, dagegen nicht löslich in Petroläther und Hexan. Das Hydrochlorid ist in Chloroform, Äther und Isopropanol schwer löslich, gut löslich ist es in Wasser (1 g/100 ml). Systematische Lösungsversuche mit Chlordiazepoxid-Hydrochlorid und der freien Base sowie den möglichen Stoffwechselprodukten wurden von PRIBILLA (1964) angestellt.

2. Verhalten gegen Säuren

Bei milder, saurer Hydrolyse (Glycin-HCl-Puffer pH 4,8) entsteht aus Chlordiazepoxid das sogenannte Lactam, bei Hydrolyse mit Salzsäure in der Wärme wird der Benzodiazepinring aufgespalten und es entsteht neben Glykokoll und Methylamin das 2-Amino-5-chlorbenzophenon (Molekulargewicht 231,69; Summenformel $C_{13}H_{10}NOCl$). 2-Amino-5-chlorbenzophenon ist leicht wasserdampfflüchtig und besitzt eine große Affinität zu Cellulose (KAMM und KELM, 1969).

Es bildet sich also bei salzsaurer Hydrolyse von Chlordiazepoxid das gleiche Spaltprodukt wie bei der Hydrolyse von Oxazepam (7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on). Eine Unterscheidung dieser beiden Wirkstoffe ist nach der Hydrolyse somit nicht mehr möglich. Der Umrechnungsfaktor zu einer äquivalenten Menge an freier Base beträgt somit 1,29, zu einem Äquivalent Hydrochlorid 1,46.



3. Schmelzpunktbestimmung

Mit Hilfe eines KOFLER-Heiztischmikroskopes wurde in eigenen Versuchen der Schmelzpunkt von 2-Amino-5-chlorbenzophenon und der Base von Chlordiazepoxid bestimmt. Dabei zeigte das Benzophenon einen scharfen Mikroschmelzpunkt bei 98°C, während das Chlordiazepoxid bei 236°C die ersten Veränderungen und schließlich bei 245°C ein Zusammenfließen der Kristalle aufwies.

4. IR-Spektrum

Chlordiazepoxid in Reinsubstanz sowie das 2-Amino-5-chlorbenzophenon wurden in eigenen Versuchen mit Hilfe der Apparatur der Firma WEBER (Stuttgart) zu KBr-Preßlingen verarbeitet, wobei 300 mg KBr und 1.5 mg

Substanz verwendet wurden. Anschließend erfolgte die Messung im Beckman IR-5-Spektralphotometer mit Kochsalzoptik (Abbildung 3, 4).

5. Lichtabsorption im Ultraviolett

Die Messung der UV-Absorptionsspektren erfolgte auf einem selbst registrierenden Beckman DK-2 A Spektrophotometer. Schichtdicke der Küvette 1 cm.

a) Messung im neutralen Bereich

Die vorliegende Reinsubstanz von Chlordiazepoxid hatte in wäßriger Lösung eine charakteristische UV-Absorptionskurve mit einem Maximum bei 260 nm. Dieses Maximum nimmt gegen das kurzwellige Licht hin langsam ab. Bei 245 bis 247 nm erscheint ein zweites Maximum, das dann einen steilen Abfall zu dem Minimum bei 217 nm zeigt. Ein weiteres drittes, jedoch flaches Maximum tritt zwischen 305 bis 309 nm auf.

b) Messung im alkalischen Bereich

Dabei wurden 3 Tropfen 30 %iger Natronlauge zu der wäßrigen Lösung in der Küvette gegeben. Das für die Messung im alkalischen Bereich charakteristische UV-Spektrum weist wiederum ein flaches Maximum zwischen 305 und 309 nm auf sowie ein Hauptmaximum bei 260 nm, das dann etwas steiler abfällt als im neutralen Bereich und bei 245 nm ein kleines Plateau zeigt. Das Absorptionsminimum findet sich bei 225 nm.

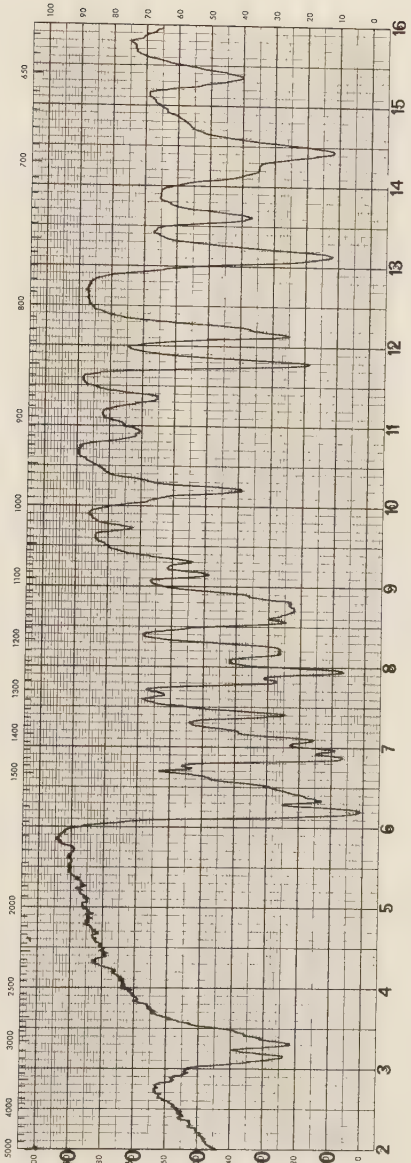


Abb. 3: IR-Spektrum von Chlordiazepoxid

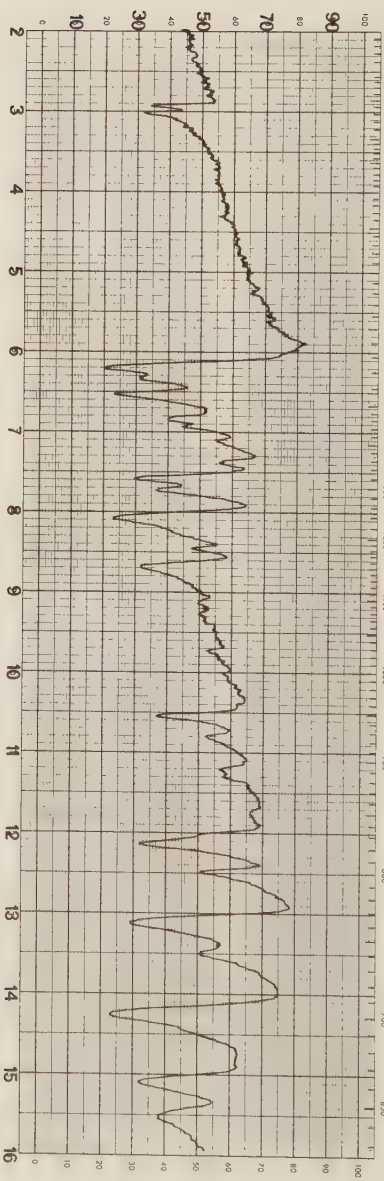


Abb. 4: IR-Spektrum von 2-Amino-5-chlorbenzophenon

c) Messung im sauren Bereich

Hierbei wurden zu der alkalischen Lösung 5 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zugesetzt. Auch hier zeigt sich ein langwelliges Maximum bei 305 bis 309 nm, das jedoch wesentlich deutlicher ist als im neutralen und alkalischen Bereich. Das Hauptmaximum liegt bei 245 nm und fällt steil zum Minimum bei 217 nm ab (Abbildung 5). OELSCHLÄGER (1963) führt das Verschwinden des Maximums bei 260 nm in saurer Lösung auf die Protonierung des N-Atoms in der Methylaminogruppe zurück.

Entsprechend vorgegangen wurde bei der UV-Messung des Hydrolyseprodukts 2-Amino-5-chlorbenzophenon (im folgenden ACB): Im neutralen Bereich ergeben sich Absorptionsmaxima bei 385 nm und 236 nm, Absorptionsminima bei 305 nm und 216 nm. Das UV-Spektrum im alkalischen Bereich entspricht etwa dem im neutralen aufgezeichneten. Im sauren Milieu zeigen sich ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, ein Absorptionsminimum bei 235 nm (Abbildung 6).

6. BRATTON-MARSHALL-Reaktion

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, 2-Amino-5-chlorbenzophenon zu diazotieren und mit dem BRATTON-MARSHALL-Reagens N-(1-Naphthyl)-Äthylendiamin-dihydrochlorid zu einem violetten Farbstoff zu kuppeln; diese Verbindung hat ein Absorptionsmaximum bei 550 nm. In leichter Abänderung der von SMYTH und PENNINGTON (1963) angegebenen Methoden wurde dabei folgendermaßen vorgegangen: Zu einer salzsauren Lösung (6 n HCl) von ACB wurden 0.5 ml einer 0.1 %igen Natriumnitritlösung, 3 Minuten später 0.5 ml einer 0.5 %igen Ammoniumsulfamat-Lösung und nach weiteren 10 Minuten

0.5 ml einer 0.1 %igen Lösung von N-(1-Naphthyl)-Äthylendiamindihydrochlorid hinzugefügt. Nach jedem Zufügen mußte gut umgeschüttelt werden. Der sich entwickelnde violette Farbstoff wurde 10 Minuten später spektrophotometrisch gemessen. Die Kurven sind in Abbildung 7 dargestellt.

7. Chromatographisches Verhalten

a) Papierchromatographie

Chlordiazepoxid und ACB wurden im aufsteigenden Verfahren auf SCHLEICHER und SCHÜLL-Papier Nr. 20 43 b MGl chromatographiert. Als Fließmittel wurde zunächst das von ALGERI und WALKER (1952) beschriebene n-Butanol, gesättigt mit 5 n Ammoniak, verwendet. Die Laufzeit betrug ca. 14 Stunden. Da sowohl Chlordiazepoxid als auch der Metabolit ACB bis zur Fließmittelfront liefen und damit im Bereich lagen, in dem sich auch die üblichen Serumbegleitstoffe finden, erwies sich dieses Fließmittel als ungeeignet für analytische Zwecke. Dasselbe ungünstige Ergebnis zeigte sich bei dem Fließmittel Ameisensäure/Butanol/Wasser im Verhältnis 1:12:7. In einem von SMYTH, PENNINGTON und JACKSON (1963) angegebenen Fließmittel: Butanol/Wasser/Eisessig (60:25:15) zeigte die Chlordiazepoxid-Base einen Rf-Wert von 0.8, das Benzophenon einen solchen von 0.9.

b) Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtplatten wurden mit Hilfe des Streichgerätes der Firma DESAGA (Heidelberg) mit Kiesel-

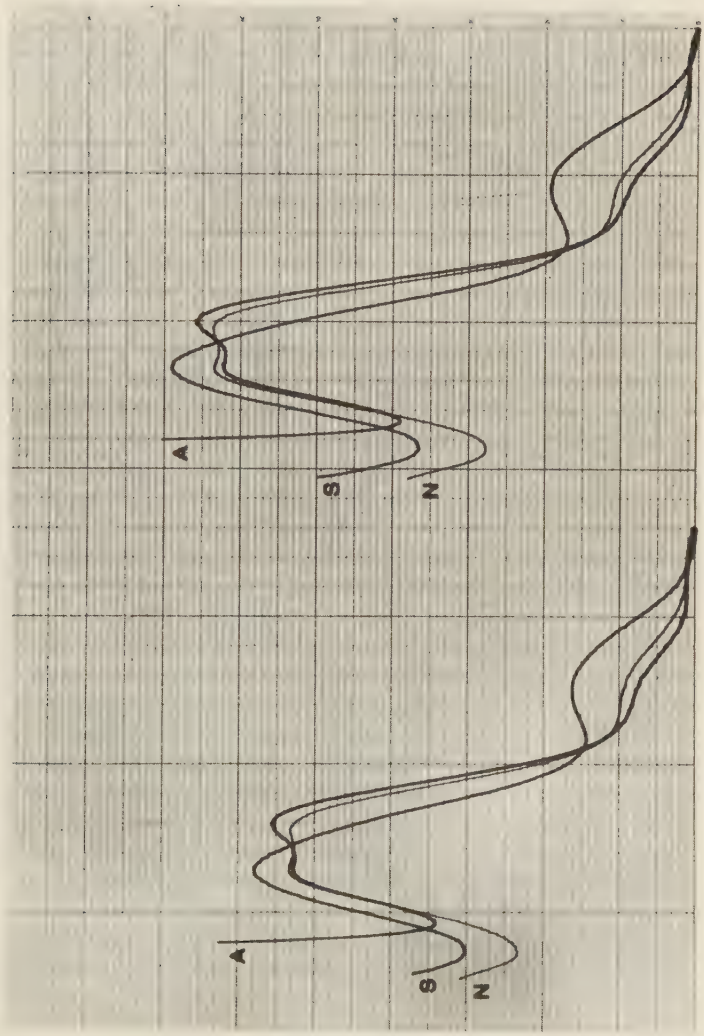


Abb. 5: UV-Absorptionskurven zweier im neutralen, alkalischen und sauren Milieu gemessenen Standardlösungen von Chlordiazepoxid (5 und 6 gamma/ml)

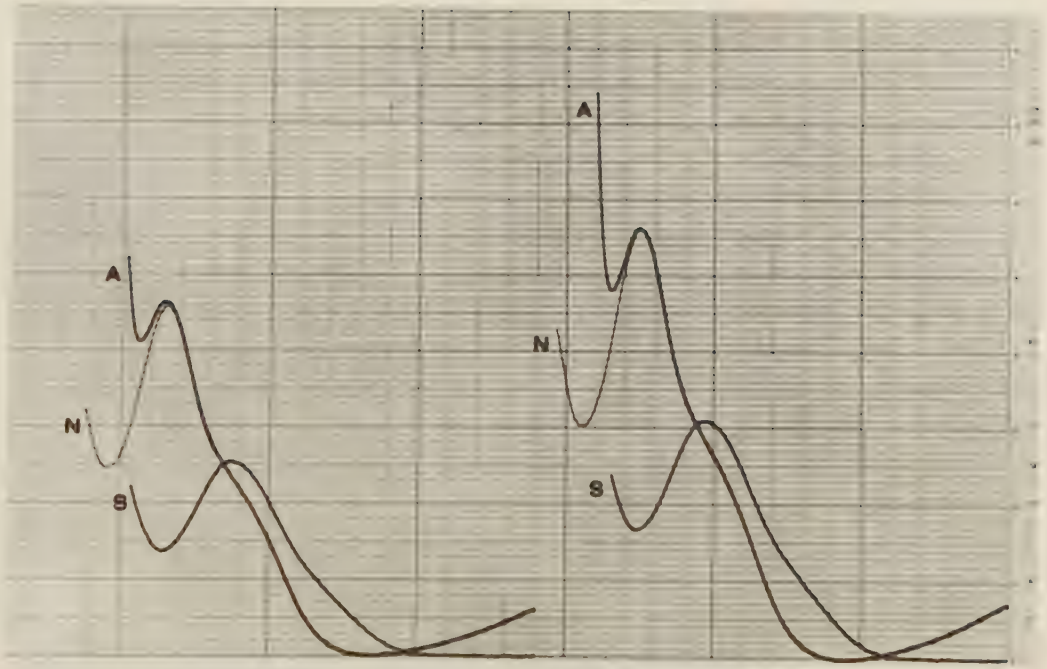


Abb. 6: UV-Absorptionskurven zweier im neutralen, alkalischen und sauren Milieu gemessenen Standardlösungen von 2-Amino-5-chlorbenzophenon

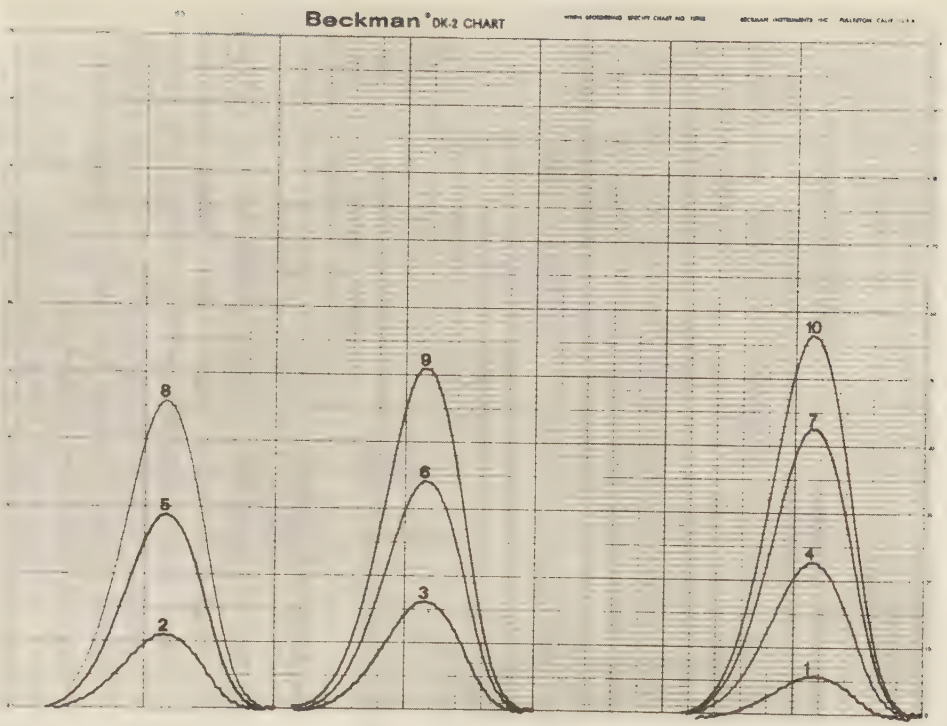


Abb. 7: Absorptionskurven der Diazoverbindung von 2-Amino-5-chlorbenzophenon nach Bratton und Marshall für 1 bis 10 gamma 2-Amino-5-chlorbenzophenon

gel HF_{254} (MERCK) in einer Schichtdicke von etwa 0.25 mm belegt. Die aufzutragenden Reinsubstanzen wurden in Methanol gelöst; die Laufstrecke betrug ca. 15 cm. Es wurden verschiedene Fließmittel ausprobiert.

Besonders geeignet waren für Chlordiazepoxid: Chloroform/Methanol (95:5), Rf-Bereich 0.6, und das von PAULUS und Mitarbeitern (1963) angegebene Fließmittel: Benzol/Äthanol/Ammoniak (50:10:5), Rf-Bereich 0.64. Für ACB wurde als besonders geeignet gefunden: Benzol, Rf-Bereich 0.5. Ein für beide Substanzen geeignetes Fließmittel ist das von BÄUMLER und RIPPSTEIN (1961) angegebene Methanol/Aceton/Triäthanolamin (50:50:1,5). Darin zeigt Chlordiazepoxid einen Rf-Wert von 0.8 und ACB einen solchen von 0.9.

8. Nachweisbarkeitsgrenzen

a) Papierchromatographie

aa) Die entwickelten Chromatogramme wurden im Trokkenschrank bei 60° eine Stunde getrocknet und dann unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm betrachtet. Beide Substanzen ließen sich bis zu einer unteren Grenze von ca. 20 gamma durch ihre Absorption nachweisen.

ab) Bei Chlordiazepoxid ergab das Besprühen mit Muniers-Reagens ab 30 gamma eine orange-rote Färbung. (Zusammensetzung der Munier'schen Sprühlösung:
Muniers Reagens A:

0,85 g Wismut(III)-nitrat, basisch
+ 10 ml Eisessig unter leichtem Erwärmen lösen
+ 40 ml Wasser

Muniers Reagens B:
20 g Kaliumjodid + 50 ml Wasser

Sprühlösung:
1 ml A + 1 ml B + 4 ml Eisessig + Sprüher mit Wasser auffüllen.)

ac) Beim ACB ergab die Diazotierung - Besprühen mit einer 0.5 %igen salzsauren Lösung von Natriumnitrit und anschließend mit einer 0.5 %igen Lösung von N-(1-Naphthyl)-Äthylendiamindihydrochlorid - ab 20 gamma eine Violettfärbung.

ad) Besprühen des Chromatogramms mit einer salzsauren Lösung von Natriumnitrit und danach mit einer Lösung von ß-Naphthol in methanolischer Kalilauge zeigte beim ACB ab 30 gamma eine braunrote Färbung.

ae) Es wurde außerdem versucht, die unter UV-Licht sichtbar gemachten Substanzflecken mit 0.5 n H_2SO_4 zu eluieren. Dazu wurden die Flecken ausgeschnitten, zerkleinert und in einem Reagenzglas mit einer abgemessenen Menge des Solvens übergossen. Nach mehrmaligem Umschütteln wurde 30 Minuten später die Säure abgegossen und spektrophotometrisch vermessen. Es ergaben sich dabei jedoch nur niedrige Chlordiazepoxid- bzw. Benzophenonkurven, trotz der größeren Substanzmenge, die auf das Papierchromatogramm gebracht worden war. Für analytische Zwecke erschien deshalb dieses Verfahren für ungeeignet.

b) Dünnschichtchromatographie

ba) Bei Betrachten der Dünnschichtplatten unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm absorbierte sowohl Chlordiazepoxid als auch Benzophenon (Fluoreszenz-Auslöschung, MACEK, VECERKOVA, 1965). Unterste Nachweisgrenze bis 0.1 gamma. Benzophenonflecken waren bereits mit freiem Auge durch ihre Eigenfarbe sichtbar.

bb) Durch Besprühen mit Muniers-Reagens färbte sich Chlordiazepoxid bis zu 0.3 bis 0.5 gamma orange-rot an. Eine schwache gelb-orange Anfärbung ergab sich bei hohen Konzentrationen mit Kaliumpermanganat-Sprühlösung (Reduktion), keine Anfärbung mit Eisen(III)chlorid, Jodplateat und Ehrlich-Sprühreagens.

bc) Durch Besprühen mit einer 0.5 %igen salzsauren Lösung von Natriumnitrit und anschließendem mit einer frisch angesetzten 0.5 %igen Lösung von N-(1-Naphthyl)-Äthylendiamindihydrochlorid ergab sich bis 0.1 gamma ACB eine Violettfärbung.

bd) Etwas weniger empfindlich war die Diazotierung durch Besprühen mit einer salzsauren Lösung von Natriumnitrit und anschließende Kupplung mit ß-Naphthol in methanolischer Kalilauge. Die untere Nachweisgrenze erstreckte sich bis zu 0.3 gamma (BÄUMLER und RIPPSTEIN, 1961).

be) Entsprechend einer nach VIDIC (1959) modifizierten Methode wurde die entwickelte Dünnschichtplatte für 5 Minuten in die Chlorkammer gestellt, danach 5 Minuten im Luftstrom ge-

trocknet und mit o-Dianisidin besprüht. Im Gegensatz zum Chlordiazepoxid färbte sich das Benzophenon ab 0.5 gamma blau-grau an; bei höheren Konzentrationen bildete sich ein braunes Zentrum.

bf) Nach längerem Liegenlassen der Dünnschichtplatten (ca. 24 Stunden) zeigte Chlordiazepoxid eine helle Fluoreszenz bei 366 nm.

9. Mikrokristallographie

Dabei wurden die von SMYTH und Mitarbeitern (1963) angegebenen Reagenzien verwendet. Mit Martinis-Reagens, das aus einer Bleinitratlösung besteht, der man so lange Kaliumjodid zufügt, bis das ausgefallene, gelb gefärbte Bleijodid in Lösung geht, bildete Chlordiazepoxid kleine, schmale Kristalle, die teils einzeln lagen, teils zu Kreuzen und Rosetten angeordnet waren. Mit Mayers-Reagens, das man dadurch herstellt, daß man einer ca. 5 %igen Quecksilberchloridlösung so lange Kaliumjodidlösung hinzufügt, bis das ausgefallene, orange gefärbte Quecksilberjodid wieder in Lösung geht, bildeten sich länglich-plumpe, an den Rändern gezähnelte Kristalle. Mit Ludy-Tengers-Reagens erfolgte keine Kristallkomplexbildung. Weiter angegebene Reagenzien zur Kristallkomplexbildung sind:

a) eine 5 %ige wäßrige Lösung von Goldchlorid. Damit soll Chlordiazepoxid Rollen mit einzelnen Nadeln bilden.
b) eine 5 %ige Lösung von Platinchlorid. Dabei sollen mit Chlordiazepoxid Rosetten mit unregelmäßig gezähnelten Blättern entstehen. Dieses Reagens soll auch das einzige sein, mit dem das Benzophenon eine Kristallkomplexbildung eingeht.

c) eine Lösung, die sich zusammensetzt aus einer Mischung von Natriumjodid (1,8 g in 6 ml Wasser) und 10 ml einer 5 %igen Lösung von Platinchlorid.

B. Vorversuche

1. Hydrolyse-Versuche

Zur Ermittlung der Hydrolyse-Ausbeute wurde eine Reihe von wäßrigen Chlordiazepoxid-Lösungen bekannter Konzentrationen mit 2 n Salzsäure eine halbe Stunde, eine Stunde, zwei und drei Stunden sowohl am Rückflußkühler bei 125°C (± 5°C) auf dem Paraffinbad gekocht als auch auf dem Wasserbad bei ca. 90°C erhitzt. Nach dem Erkalten wurden die Proben auf ein pH von 10 - 11 mit 10 %iger Natronlauge eingestellt und dreimal mit Äther extrahiert.

Zunächst wurde dann versucht, das bei der Hydrolyse von Chlordiazepoxid entstandene gelb gefärbte 2-Amino-5-chlorbenzophenon aus der Ätherphase mit Säure zu reextrahieren, um den Reextrakt direkt spektrophotometrisch vermessen zu können. Dabei zeigte sich, daß die Reextraktion mit keiner der dafür in Betracht kommenden Säuren möglich war. Zum gleichen Ergebnis kamen auch BEYER und SADEE (1969 b).

Im weiteren wurden daher die vereinigten Ätherphasen durch Zugabe von 100 - 300 mg geglühtem Natriumsulfat entwässert und nach Abdekantieren vom Trockenmittel der Äther auf dem Wasserbad verdampft. Der Rückstand wurde nun in 2 ml 2 n Schwefelsäure unter Schwenken gelöst und spektrophotometrisch gemessen. Es zeigte

sich, daß Chlordiazepoxid bereits durch einstündiges Kochen bei 125°C unter Rückfluß quantitativ in das Benzophenon überführt wird, während dies auf dem Wasserbad erst nach drei Stunden möglich ist. Versuche mit höher konzentrierter Salzsäure lieferten dieselben Ergebnisse.

2. Extraktionsversuche mit und ohne Eiweißfällung

Es wurden mehrere Serum-Proben (jeweils 3 ml Rinderserum) mit einem bestimmten Zusatz von Chlordiazepoxid nach der noch näher zu beschreibenden Methode extrahiert und mit 2 n Schwefelsäure reextrahiert. Ferner wurde eine gleiche Anzahl von Serum-Proben erst nach der Eiweißfällung extrahiert und reextrahiert. Dabei wurden zu 3 ml Serum 1 ml 70 %ige Perchlorsäure und ca. 2 ml destilliertes Wasser gegeben. Nach 10 minütigem Zentrifugieren wurde der obere Teil vorsichtig abgegossen und der Bodensatz nochmals mit Wasser aufgewirbelt und erneut zentrifugiert. Die obere Schicht wurde zu der vorangehenden geschüttet und nach Alkalisierung extrahiert. Die Extinktionswerte der spektrophotometrisch gemessenen Reextrakte zeigten, daß die Extraktionsausbeute durch Eiweißfällung nicht erhöht werden konnte. Diese Ergebnisse stimmen mit den Extraktionsversuchen anderer Autoren überein (COCHIN und DALY, 1963).

3. Extraktionsversuche mit Chloroform

Einige Serumproben mit einem hohen Zusatz von Chlordiazepoxid wurden, nachdem sie alkalisch gemacht worden waren, mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die gesammelten Chloroformphasen wurden anschließend mit mehreren ml 2 n Schwefelsäure reextrahiert und der Reextrakt spektrophotometrisch gemessen. Im allgemeinen

war dabei die Extraktionsausbeute nicht größer als mit der üblichen Ätherextraktion. Die Reextraktion aus der Chloroformphase war technisch wesentlich schwerer, weil sich die Säure im oberen Teil des Schütteltrichters ansammelte. Eine Reextraktion mit kleineren Säuremengen war daher praktisch kaum auszuführen.

4. Säulenchromatographisches Verfahren zur Isolierung von ACB aus Serum

Entsprechend einem von KAMM und BAIER (1969) angegebenen Verfahren zur Darstellung von 2-Amino-5-chlorbenzophenon wurde versucht, eine quantitative Bestimmung von Chlordiazepoxid über sein Hydrolyseprodukt zu erreichen. Eine Serumprobe (Rinderserum) mit einem hohen Zusatz von Chlordiazepoxid wurde zur Hydrolyse eine Stunde am Rückflußkühler gekocht und anschließend nach Alkalisierung mit Äther extrahiert. Dafür wurde stets nur destillierter Äther verwendet.

Es wurde nun Kieselgel-G-Merck (0.05 - 0.2 mm) in Benzol aufgeschwemmt und in eine ca. 50 cm lange Säule gefüllt, der eingedampfte Rückstand des Ätherextraktes in Benzol gelöst und auf die Säule aufgetragen. Es entwickelten sich zwei stark gefärbte Zonen, die klar voneinander getrennt waren. Die erste Zone entsprach den üblichen Serum-Begleitstoffen, die zweite mit Benzol eluierte zeigte ein Absorptionsmaximum bei 383 nm und nach Abdampfen des Benzols und Auflösen des Rückstandes in Methanol ein deutlich höheres Maximum bei 237 nm.

Weitere Versuche mit kleineren Zusatzmengen zeigten, daß die Säulenchromatographie zwar möglich ist, sich

jedoch für kleinste Mengen ACB praktisch nicht eignet, da dann die ACB-Zone mit dem Auge nicht mehr sichtbar ist. Für solche Zwecke müßte man die Erscheinungszeit des ACB mit der Stoppuhr messen oder aber eine Quarz-Säule benutzen, um die Fluoreszenz-Auslöchsung des Trägermaterials durch ACB unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm auszunutzen. Die gewonnene Fraktion müßte dann vor der spektrophotometrischen Messung noch auf ein kleineres Volumen eingeengt werden.

5. Dünnschichtchromatographisches Verfahren

a) Zur Isolierung von Chlordiazepoxid aus Serum

Es wurde wiederum eine bestimmte Menge Chlordiazepoxid zu Rinderserum zugesetzt und in alkalischem Milieu dreimal mit Äther extrahiert. Der Extrakt wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel auf dem Wasserbad abgedampft. Der Rückstand wurde durch Spülen mit Methanol quantitativ aus der Abdampfschale auf eine präparative Dünnschichtplatte übertragen. Um bei dem strichförmigen Auftragen Beschädigungen der Dünnschicht zu verhindern, wurde ein auf beiden Seiten offenes Schmelzpunktröhrchen benutzt, in das ein ca. 0.5 cm langer Faden pinselartig eingeführt worden war. Als Fließmittel diente wiederum 95 Teile Chloroform und 5 Teile Methanol.

Nach einer Laufstrecke von 15 cm wurde die Platte aus dem Fließmittel genommen und getrocknet. Durch Betrachten der Platten unter der UV-Lampe mit der Wellenlänge 254 nm wurden die bandförmigen Zonen bei einem Rf-Wert von 0.5 bis 0.6 markiert. Daß es sich dabei um Chlordiazepoxid handeln mußte, konnte

durch am Rand mitlaufende Kontrollen der in Methanol gelösten Reinsubstanz gezeigt werden.

Mit einem geeigneten Spatel wurden nun die markierten Zonen abgekratzt und in einem Reagenzglas mehrmals mit Diäthyläther aufgekocht. Der Äther wurde danach über 2 Faltenfilter klarfiltriert und in einer kleinen Schale abgedampft. Der Rückstand wurde in 2 n Schwefelsäure durch Schwenken gelöst und gegen ein entsprechend aufgearbeitetes Leerzonen-Eluat spektrophotometrisch gemessen. Dabei ergab sich ein Absorptionsmaximum bei 245 nm, das also mit dem einer im sauren Bereich gemessenen Standardlösung der Reinsubstanz identisch ist.

Als weiteres Mittel, um Chlordiazepoxid von einer präparativen Dünnschichtplatte zu eluieren, wurde Methanol gewählt. Dabei erwies es sich als vorteilhaft, die Dünnschichtplatte zuvor ca. 30 Minuten in Elutionsmittel zu konditionieren. Eluiert wurde dann entsprechend durch ca. 30 Minuten Erhitzen der Kieselgelschicht mit Methanol auf dem Wasserbad. Die methanolische Lösung konnte nach Klarfiltrieren über zwei Faltenfilter direkt spektrophotometrisch gegen ein gleich aufgearbeitetes Leerzonen-Eluat gemessen werden. Die aufgezeichnete UV-Kurve zeigte den gleichen Verlauf wie eine im neutralen Bereich gemessene Lösung der Reinsubstanz.

b) Zur Isolierung von 2-Amino-5-chlorbenzophenon aus Serum

Serum (Rind) mit einem Zusatz von ACB oder Serum, dem Chlordiazepoxid-Reinsubstanz zugesetzt und zur

Hydrolyse eine Stunde unter Rückflußkühlung gekocht worden war, wurde nach der oben beschriebenen Methode (B 5 a) aufgearbeitet. Der Rückstand des Ätherextraktes wurde nach Auflösen in Methanol quantitativ auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Als Fließmittel diente Benzol. Nach ca. 30 Minuten wurde die Platte aus der Kammer genommen und, nachdem sie getrocknet war, unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm betrachtet. Die Zone bei einem Rf-Bereich von 0.5 wurde markiert. Dieser Bereich entsprach dem ACB, wie sich durch einen mitaufgetragenen Vergleichsfleck einer methanolischen Lösung von ACB zeigen ließ. Eluiert wurde 30 Minuten mit 2 n Schwefelsäure, die nach Klarfiltrieren direkt gemessen werden konnte. Sie zeigte denselben Verlauf wie eine im sauren Bereich gemessene Lösung von ACB.

Sämtliche hier aufgezeigten dünnschichtchromatographischen Verfahren zur Isolierung von Chlordiazepoxid oder ACB aus Serum und anschließender spektrophotometrischen Messung eignen sich recht gut zur quantitativen Bestimmung größerer Mengen von Chlordiazepoxid. Da aber der Verlust von etwa 30 % bei diesem Verfahren als zu hoch erschien - und damit dieses Verfahren zum quantitativen Nachweis kleinerer Mengen ungeeignet ist -, wurde im weiteren darauf verzichtet.

C. Statistische Formeln

Die zur Aufstellung von Eichkurven notwendigen Berechnungen wurden mit einem mechanischen Tischrechner (Diehl combitron S) ausgeführt und auf ihre Richtigkeit mehr-

mals überprüft.

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse waren Durchschnittswerte und Standardabweichungen erforderlich. Weiterhin mußten Regressionsgeraden und die Standardabweichungen der Regressionsgeraden ermittelt werden. Zu diesen Berechnungen wurden nach FREUDENBERG (1962) und DOERFEL (1962) folgende Formeln verwendet:

1. Durchschnittswert:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{N}$$

2. Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2}{N} - \bar{x}^2} \cdot \frac{N}{N-1}$$

3. Regressionsgerade:

$$y = a + bx$$

$$b = \frac{\sum xy - N\bar{x}\bar{y}}{\sum x^2 - N\bar{x}^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

4. Standardabweichung der Regressionsgeraden:

$$s_b = \frac{s}{\sqrt{\sum x^2 - N\bar{x}^2}}$$

$$s_a = s_b \sqrt{\frac{x^2}{N}}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (y - Y)^2}{N - 2}}$$

$$(y - Y)^2 = \sum y^2 - N\bar{y}^2 - b^2 \left(\sum x^2 - N\bar{x}^2\right)$$

D. Analytik

Aufstellung von Eichkurven

a) Standardlösungen der Reinsubstanzen

aa) Chlordiazepoxid

Zur Erfassung des methodischen Fehlers wurden insgesamt 10 Stammlösungen angesetzt, die jeweils 25 mg Chlordiazepoxid-Base in 25 ml Methanol enthielten. Aus jeder der Stammlösungen wurden nun jeweils 10 wäßrige Standardlösungen hergestellt, die 1 bis 10 gamma Wirkstoff pro ml aufwiesen. Somit standen für die Versuche insgesamt 100 Standardlösungen zur Verfügung. Die Standardlösungen wurden unmittelbar vor den Messungen frisch angesetzt. Die Messungen wurden mit dem Beckman-Spektrophotometer durchgeführt, die Meßwerte im neutralen und alkalischen Milieu in Tabelle 2, die Meßwerte für den sauren Bereich in Tabelle 3 dargestellt. Die Messungen erfolgten wie in Abschnitt A 5 "Lichtabsorption im Ultraviolett" beschrieben. Es zeigte sich, daß die gemessenen Extinktionen den jeweiligen Konzentrationen direkt proportional waren; das heißt die zu bestimmenden Eichkurven bilden in dem gewählten Konzentrationsbereich eine Gerade und erfüllen somit das Lambert-Beersche Gesetz.

Da für die weiteren Untersuchungen nur Messungen im sauren Milieu durchgeführt wurden, sind in Tabelle 3 zur besseren Veranschaulichung Mittelwerte und deren Standardabweichungen eingetragen. Die Abweichungen nach oben und

unten liegen zwischen 2 und 8 %; sie betragen im Durchschnitt etwa 4 %. In Tabelle 4 wurden nun die durchschnittlichen Meßwerte und deren Standardabweichungen für die Messungen im sauren, neutralen und alkalischen Bereich aufgeführt.

Im Anschluß daran wurden mit Hilfe der aufgeführten statistischen Formeln die Regressionsgeraden der einzelnen Messungen sowie die Regressionsgeraden der zugehörigen Standardabweichungen berechnet.

Die erhaltenen Eichkurven werden hier zunächst in mathematischer Form - mit den entsprechenden Zwischenwerten der statistischen Berechnungen - aufgeführt und anschließend in den Abbildungen 8 bis 11 dargestellt.

Eichkurve im neutralen Milieu:

$b = + 0{,}10518848$ $\qquad s = \pm 0{,}02500739$

$a = - 0{,}00734664$ $\qquad s_a = \pm 0{,}00540218$

$$s_b = \pm 0{,}00087064$$

Somit lautet die Regressionsgerade

$$y = 0{,}10518848\ x - 0{,}00734664$$

die Regressionsgeraden der Standardabweichungen

$$y_1 = 0{,}10605912\ x - 0{,}00194446$$

$$y_2 = 0{,}10431784\ x - 0{,}01274882$$

N		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	gamma/ml
1	n	0.090	0.190	0.290	0.390	0.490	0.580	0.690	0.810	0.890	1.010	
	a	0.090	0.200	0.295	0.405	0.510	0.595	0.705	0.830	0.915	1.030	
2	n	0.110	0.215	0.320	0.425	0.535	0.635	0.730	0.860	1.040	1.130	
	a	0.110	0.220	0.320	0.430	0.555	0.660	0.750	0.870	1.030	1.120	
3	n	0.090	0.195	0.290	0.390	0.500	0.580	0.680	0.790	0.890	0.980	
	a	0.095	0.200	0.300	0.405	0.515	0.595	0.705	0.820	0.910	1.010	
4	n	0.100	0.205	0.310	0.450	0.530	0.605	0.730	0.830	0.930	1.070	
	a	0.105	0.215	0.320	0.425	0.530	0.625	0.740	0.855	0.950	1.035	
5	n	0.095	0.200	0.295	0.405	0.520	0.630	0.720	0.835	0.925	1.110	
	a	0.100	0.205	0.335	0.410	0.525	0.640	0.730	0.855	0.950	1.055	
6	n	0.100	0.210	0.300	0.415	0.510	0.620	0.715	0.825	0.930	1.030	
	a	0.105	0.215	0.315	0.420	0.520	0.635	0.730	0.840	0.950	1.045	
7	n	0.110	0.220	0.310	0.420	0.530	0.630	0.745	0.870	0.960	1.060	
	a	0.110	0.220	0.315	0.430	0.535	0.640	0.755	0.875	0.985	1.065	
8	n	0.105	0.215	0.315	0.405	0.520	0.620	0.730	0.830	0.945	1.040	
	a	0.105	0.220	0.320	0.415	0.535	0.640	0.740	0.855	0.960	1.050	
9	n	0.100	0.215	0.320	0.430	0.530	0.650	0.755	0.860	0.965	1.075	
	a	0.105	0.220	0.330	0.435	0.545	0.670	0.800	0.875	0.985	1.085	
10	n	0.105	0.210	0.320	0.405	0.520	0.615	0.730	0.810	0.940	1.020	
	a	0.110	0.210	0.320	0.410	0.530	0.620	0.740	0.820	0.960	1.050	

Tabelle 2: Extinktionswerte der im neutralen und alkalischen Bereich gemessenen Standardlösungen von Chlordiazepoxid

N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 gamma/ml
1	0.095	0.210	0.320	0.430	0.545	0.630	0.745	0.875	0.985	1.095
2	0.125	0.235	0.345	0.470	0.580	0.690	0.780	0.935	1.135	1.230
3	0.105	0.215	0.315	0.430	0.545	0.630	0.740	0.855	0.960	1.060
4	0.115	0.235	0.335	0.450	0.565	0.660	0.790	0.900	1.005	1.115
5	0.110	0.220	0.360	0.440	0.565	0.695	0.775	0.910	1.000	1.110
6	0.120	0.220	0.340	0.450	0.550	0.670	0.780	0.890	1.005	1.100
7	0.125	0.235	0.340	0.455	0.565	0.680	0.795	0.925	1.050	1.120
8	0.120	0.240	0.345	0.445	0.560	0.670	0.780	0.900	1.020	1.110
9	0.120	0.245	0.350	0.480	0.580	0.700	0.815	0.930	1.050	1.150
10	0.120	0.235	0.345	0.440	0.565	0.660	0.785	0.870	1.020	1.115
y_{gesamt}	1.155	2.290	3.395	4.490	5.620	6.685	7.785	8.990	10.230	11.205
$\bar{y}$	0.1155	0.2290	0.3395	0.4490	0.5620	0.6685	0.7785	0.8990	1.0230	1.1205
s_y $\pm$	0.0091	0.0111	0.0128	0.0153	0.0119	0.0184	0.0210	0.0255	0.0454	0.0423

Tabelle 3: Extinktionswerte der im sauren Bereich gemessenen Standardlösungen von Chlordiazepoxid, Mittelwerte und Standardabweichungen

Konzentration in gamma/ml	sauer		neutral		alkalisch	
	$\bar{y}$	$s_y^{\pm}$	$\bar{y}$	$s_y^{\pm}$	$\bar{y}$	$s_y^{\pm}$
1	0.1155	0.009069	0.1005	0.006874	0.1035	0.006344
2	0.2290	0.011136	0.2075	0.009287	0.2125	0.007826
3	0.3395	0.012835	0.3070	0.011662	0.3170	0.011446
4	0.4490	0.015297	0.4135	0.017614	0.4185	0.010500
5	0.5620	0.011874	0.5185	0.013793	0.5300	0.012845
6	0.6685	0.018446	0.6165	0.021570	0.6320	0.023152
7	0.7785	0.020982	0.7225	0.021708	0.7395	0.026739
8	0.8990	0.025475	0.8320	0.024104	0.8495	0.020056
9	1.0230	0.045398	0.9415	0.040562	0.9595	0.033125
10	1.1205	0.042276	1.0525	0.043546	1.0545	0.029022

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der im sauren, neutralen und alkalischen Bereich gemessenen Standardlösungen von Chlordiazepoxid-Base

Eichkurve im alkalischen Milieu:

$b = + 0{,}10615454$ $\quad s = \pm 0{,}02056623$

$a = - 0{,}00219997$ $\quad s_a = \pm 0{,}00444279$

$s_b = \pm 0{,}00071602$

Somit lautet die Regressionsgerade

$$y = 0{,}10615454\ x - 0{,}00219997$$

die Regressionsgeraden der Standardabweichungen

$$y_1 = 0{,}10687056\ x + 0{,}00224282$$

$$y_2 = 0{,}10543852\ x - 0{,}00664276$$

Eichkurve im sauren Milieu:

$b = + 0{,}11209393$ $\quad s = \pm 0{,}02573771$

$a = + 0{,}0019338$ $\quad s_a = \pm 0{,}00555997$

$s_b = \pm 0{,}00089607$

Somit lautet die Regressionsgerade

$$y = 0{,}11209393\ x + 0{,}0019338$$

die Regressionsgeraden der Standardabweichungen

$$y_1 = 0{,}11299\ x + 0{,}00749377$$

$$y_2 = 0{,}11119786\ x - 0{,}00362617$$

ab) 2-Amino-5-chlorbenzophenon (ACB)

Hier wurden fünf Stammlösungen angesetzt, die 25 mg ACB in 25 ml Methanol, oder 1000 gamma ACB pro ml, enthielten. Aus diesen Stammlö-

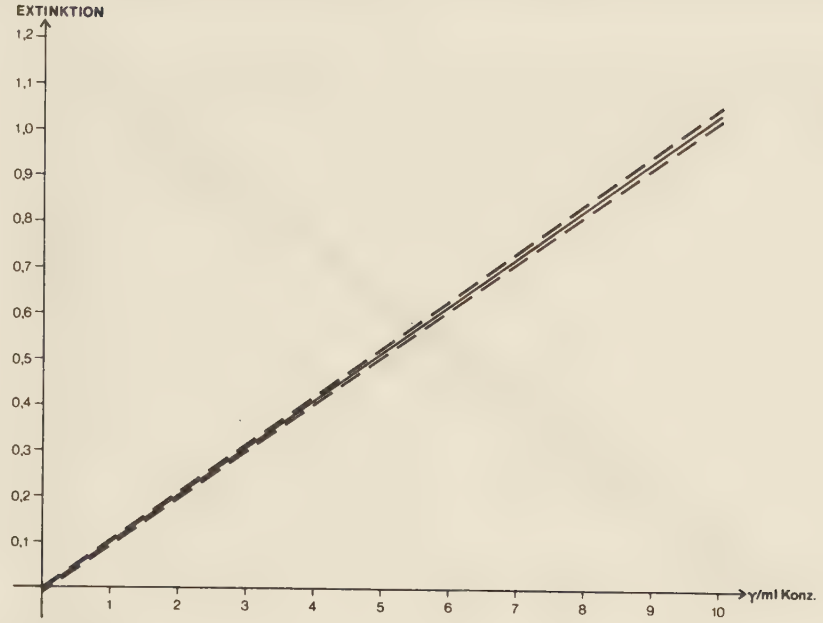


Abb. 8: Regressionsgerade und Regressionsgeraden der Standardabweichungen für 1 bis 10 gamma/ml Chlordiazepoxid gemessen im neutralen Milieu bei 260 nm

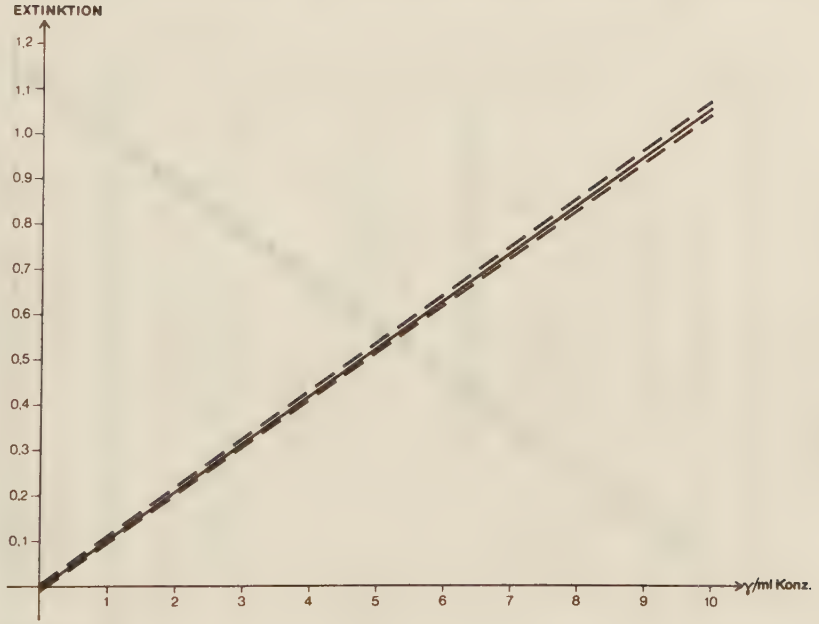


Abb. 9: Regressionsgerade und Regressionsgeraden der Standardabweichungen für 1 bis 10 gamma/ml Chlordiazepoxid gemessen im alkalischen Milieu bei 260 nm

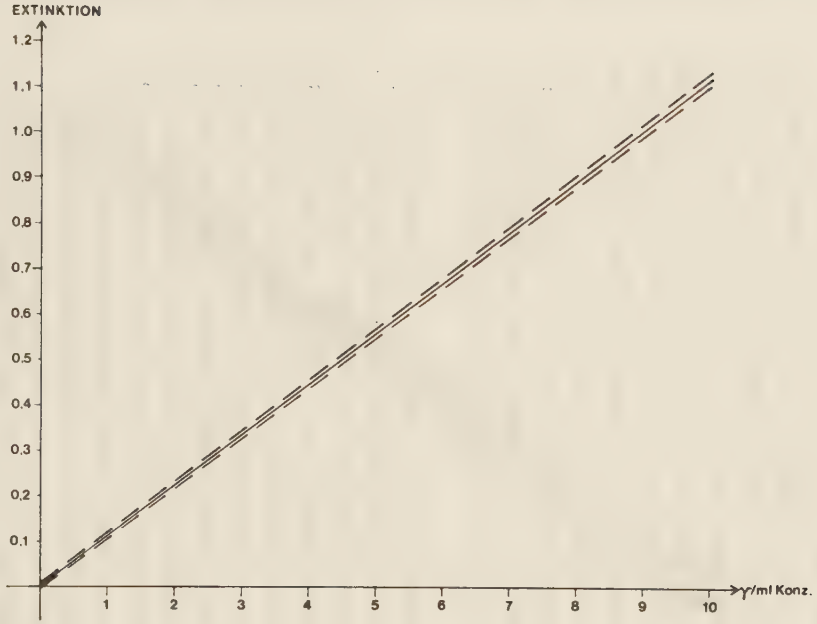


Abb. 10: Regressionsgerade und Regressionsgeraden der Standardabweichungen für 1 bis 10 gamma/ml Chlordiazepoxid gemessen im sauren Milieu bei 245 nm

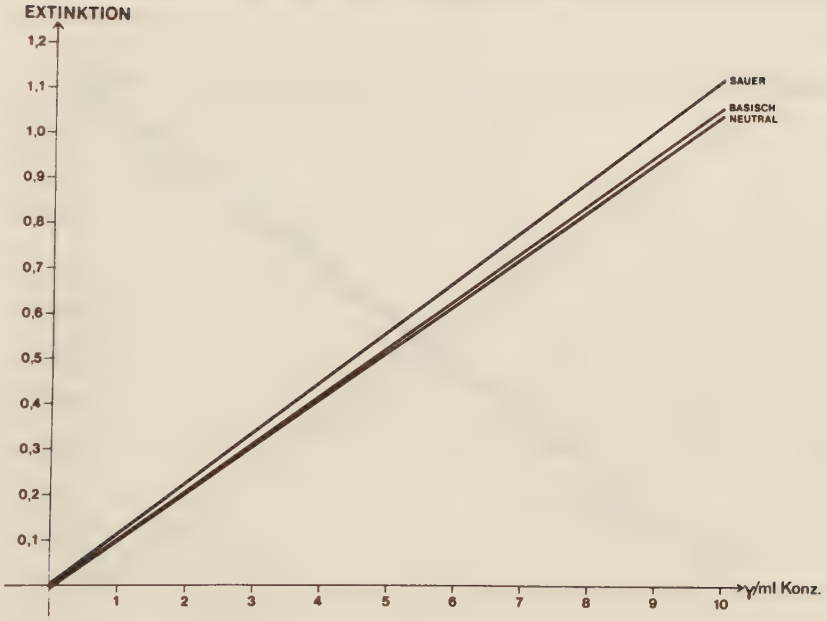


Abb. 11: Vergleich der Regressionsgeraden im sauren, neutralen und basischen Milieu für 1 bis 10 gamma Chlordiazepoxid

sungen wurden jeweils 10 Standardlösungen - halb Wasser, halb Methanol - von 1 bis 10 gamma/ml hergestellt. Nunmehr wurden in mit Chromschwefelsäure gereinigte sogenannte ADH-Gläschen jeweils 0.5 ml 6 n Salzsäure und 1 ml der jeweiligen Standardlösung einpipettiert. Nach gutem Umschütteln wurden 0.5 ml einer 0,1 %igen frisch angesetzten Natriumnitritlösung hinzugefügt, wiederum gut geschüttelt, 3 Minuten später nach Zugabe von 0.5 ml einer frisch angesetzten 0.5 %igen Ammoniumsulfamatlösung erneut gut geschüttelt und schließlich nach weiteren 10 Minuten 0.5 ml einer frisch angesetzten 0.1 %igen Lösung von N(1-Naphthyl)-Äthylendiamindihydrochlorid zugesetzt (Diazotierung nach Bratton und Marshall).

Der nunmehr entstehende violette Farbstoff wurde nach genau 10 Minuten spektrophotometrisch gemessen und die Extinktionswerte in Tabelle 5 aufgeführt. Das Absorptionsmaximum lag bei 550 nm; die Messung erfolgte daher im sichtbaren Bereich des Spektrums, beginnend bei 650 nm. Gemessen wurde stets gegen einen entsprechend aufgearbeiteten Leerwert in der Vergleichsküvette. Auch hier wurde anschließend die Regressionsgerade sowie die Regressionsgeraden der Standardabweichungen berechnet. Die Tabelle 5 wurde weiterhin mit den Mittelwerten und den dazugehörigen Standardabweichungen der Messungen in den einzelnen Konzentrationsbereichen ergänzt und die Geraden in Abbildung 12 dargestellt.

Eichkurve des 2-Amino-5-chlorbenzophenons:

$b = + 0{,}05530909$ $\qquad s = \pm 0{,}02825809$

Anzahl der Messungen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.030	0.095	0.145	0.225	0.270	0.345	0.395	0.420	0.500	0.580
2	0.035	0.095	0.135	0.175	0.210	0.240	0.325	0.400	0.410	0.570
3	0.050	0.110	0.160	0.210	0.260	0.310	0.370	0.420	0.465	0.480
4	0.055	0.110	0.170	0.210	0.270	0.340	0.385	0.460	0.525	0.545
5	0.055	0.110	0.160	0.225	0.290	0.340	0.425	0.455	0.510	0.565
y_{gesamt}	0.225	0.520	0.770	1.045	1.300	1.575	1.900	2.155	2.410	2.740
$\bar{y}$	0.045	0.104	0.154	0.209	0.260	0.315	0.380	0.431	0.482	0.548
$s_y \pm$	0.0105	0.0073	0.0124	0.0183	0.0268	0.0395	0.0329	0.0229	0.0411	0.0359

Tabelle 5: Extinktionswerte von 1 bis 10 gamma 2-Amino-5-chlorbenzophenon, bestimmt nach der Bratton-Marshall-Reaktion.

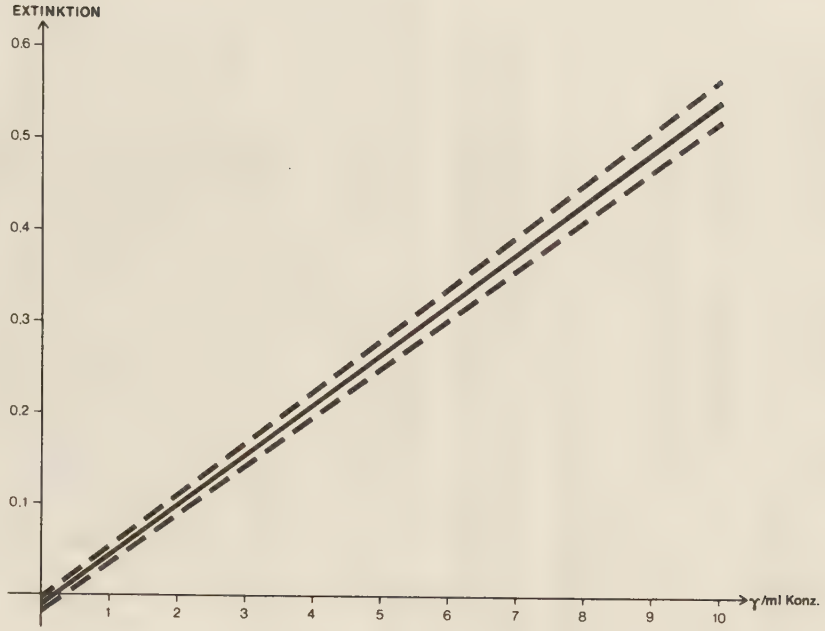


Abb. 12: Regressionsgerade und Regressionsgeraden der Standardabweichungen des nach Bratton und Marshall diazotierten 2-Amino-5-chlorbenzophenon (1 bis 10 gamma)

$a = - 0{,}0114$ $\qquad s_b = \pm 0{,}00139133$

$s_a = \pm 0{,}00863298$

Somit lauten die Regressionsgerade

$$y = 0{,}5530909\ x - 0{,}0114$$

und die Regressionsgeraden der Standardabweichungen

$$y_1 = 0{,}05670042\ x - 0{,}00276702$$
$$y_2 = 0{,}05391776\ x - 0{,}02003298$$

b) Extraktionsversuche

ba) Zusatzversuche mit Chlordiazepoxid-Reinsubstanz zu Rinderserum (Reextraktionsmethode)

Zu 3 ml Rinderserum wurden jeweils 1 ml einer wäßrigen Standardlösung (1 bis 10 gamma/ml) mit Chlordiazepoxid-Base und 2 ml Wasser zugesetzt und gut geschüttelt. Mit 10 %iger Natronlauge wurde das Serum auf ein pH von 10 bis 11 eingestellt und anschließend dreimal 5 Minuten mit destilliertem Diäthyläther ausgeschüttelt. Um besonders saubere Ätherphasen zu erhalten, mußte im Anschluß an die einzelnen Extraktionsvorgänge mehrere Minuten gewartet werden, bevor das Serum abgelassen werden konnte. Nach dem Ablassen der Serumphase wurde noch einmal kurz durchgeschüttelt, um dadurch das restliche Serum zu entfernen. Erst danach durften die einzelnen Ätherextrakte gesammelt werden. Der gesamte Ätherextrakt wurde schließlich noch mit Wasser ausgewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet.

Daraufhin erfolgte die Einengung des Ätherextraktes auf dem Wasserbad bis auf ein Volumen von ca. 20 ml. Nach dem Erkalten der Ätherphase wurde mit jeweils 1 ml 2 n Schwefelsäure 8 Minuten lang kräftig geschüttelt, um die zugesetzte Substanz zu reextrahieren. Diese Reextraktion erfolgte in einem 50 ml fassenden Schütteltrichter, bei dem es möglich war, das nach dem Schütteln sich unten ansammelnde Säurevolumen von 1 ml exakt von der Ätherphase zu trennen. Der Reextrakt wurde direkt in Quarzmikroküvetten (Schichtdicke 1 cm) abgelassen und die Extinktion spektrophotometrisch - gegen einen entsprechend aufgearbeiteten Serumleerextrakt - gemessen. Es war darauf zu achten, die Messung möglichst sofort auf die Reextraktion folgen zu lassen, um ein Zersetzen der Substanz zu vermeiden. Insgesamt wurden für jede Konzentration von 1 bis 10 gamma Chlordiazepoxid 10 Zusatzversuche - also insgesamt 100 Arbeitsgänge - vorgenommen.

Nunmehr wurde mit Hilfe der gewonnenen 100 Meßwerte eine Regressionsberechnung zur Ermittlung der Regressionsgeraden der Zusatzversuche sowie der Regressionsgeraden der dazugehörigen Standardabweichungen durchgeführt. Weiterhin wurde die Tabelle 6 durch die Mittelwerte und deren Standardabweichungen für die Messungen in den einzelnen Konzentrationsbereichen ergänzt und die Regressionsgeraden in Abbildung 13 dargestellt.

Mit Hilfe der bei der Regressionsberechnung für die Eichkurve der Reinsubstanz - gemessen im sauren Bereich - erhaltenen Werte wurde die

Anzahl der Messungen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.050	0.135	0.275	0.345	0.475	0.595	0.620	0.690	0.705	0.865
2	0.115	0.225	0.320	0.420	0.535	0.605	0.725	0.840	0.950	1.080
3	0.100	0.200	0.170	0.260	0.415	0.520	0.660	0.740	0.860	1.070
4	0.050	0.105	0.240	0.385	0.460	0.540	0.630	0.770	0.875	1.010
5	0.100	0.185	0.275	0.415	0.485	0.635	0.735	0.790	0.980	1.025
6	0.100	0.175	0.245	0.355	0.480	0.580	0.685	0.860	0.970	0.935
7	0.075	0.160	0.250	0.320	0.475	0.580	0.660	0.790	0.915	0.960
8	0.080	0.180	0.280	0.420	0.510	0.560	0.750	0.840	1.010	1.095
9	0.075	0.155	0.315	0.400	0.500	0.615	0.680	0.875	0.975	1.050
10	0.090	0.225	0.305	0.390	0.505	0.615	0.740	0.895	0.930	1.075
y_{gesamt}	0.835	1.745	2.675	3.710	4.840	5.845	6.885	8.090	9.170	10.165
$\bar{y}$	0.0835	0.1745	0.2675	0.3710	0.4840	0.5845	0.6885	0.8090	0.9170	1.0165
s_y $\pm$	0.0206	0.0359	0.0421	0.0646	0.0308	0.0342	0.0444	0.0612	0.0837	0.0711

Tabelle 6: Zusatzversuche von Chlordiazepoxid-Base zu Rinderserum, Extinktionswerte des über Säurereextraktion bestimmten Chlordiazepoxids

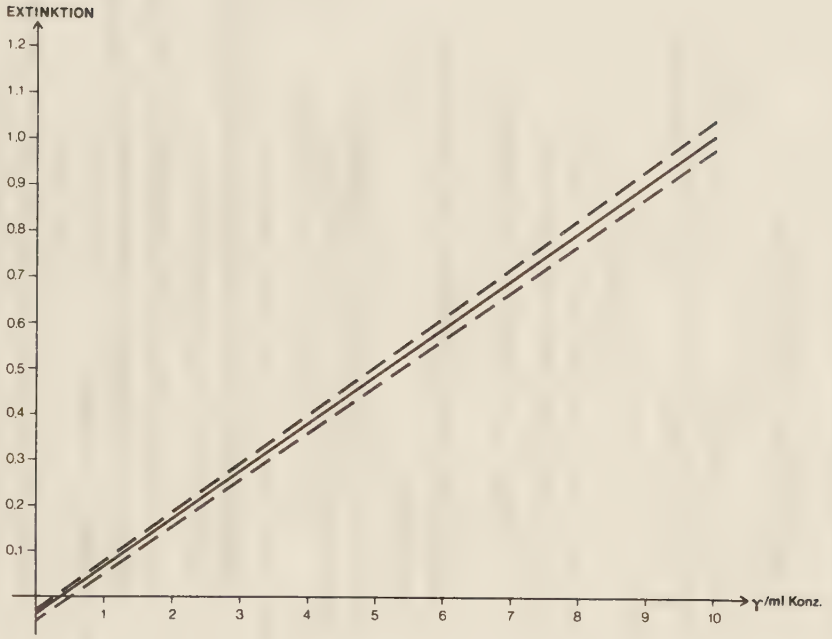


Abb. 13: Regressionsgerade und Regressionsgeraden der Standardabweichungen für Chlordiazepoxid, gemessen bei 245 nm, nach Zusatz und Wiedergewinnung aus Rinderserum

mittlere Extraktionsausbeute bestimmt und außerdem der Extraktionsverlust noch in Form einer mathematischen Gleichung angegeben, um für eine ganz beliebige Konzentration den dafür charakteristischen Extraktionsverlust berechnen zu können.

Eichkurve der Zusatzversuche:

$b = + 0{,}10518181$ $\qquad s = \pm 0{,}05207283$

$a = - 0{,}03889996$ $\qquad s_b = \pm 0{,}00181294$

$$s_a = \pm 0{,}011249$$

Somit lauten die Regressionsgerade

$$y = 0{,}10518181\ x - 0{,}03889996$$

und die Regressionsgeraden der Standardabweichungen

$$y_1 = 0{,}10699475\ x - 0{,}02765096$$

$$y_2 = 0{,}10336887\ x - 0{,}05014896$$

Berechnung der mittleren Extraktionsausbeute:

Der Mittelwert aller Extinktionswerte der Reinsubstanz, gemessen im sauren Bereich ($\bar{y}_{sauer}$), beträgt 0,61845.

Der Mittelwert aller Extinktionswerte der Zusatzversuche ($\bar{y}_{Zusatz}$) beträgt 0,5396.

Es gilt also der Ansatz:

$$\text{Extraktionsausbeute} = \frac{100 \cdot \bar{y}_{Zusatz}}{\bar{y}_{sauer}} \ \%$$

$$\frac{100 \cdot 0{,}5396}{0{,}61845} = 87\ \%$$

Extraktionsverlust in mathematischer Form:

Regressionsgerade der Reinsubstanz - im sauren -

$$y_{Chlordiazepoxid} = 0{,}11209393\ x + 0{,}0019338$$

Regressionsgerade der Zusatzversuche:

$$y_{Zusatz} = 0{,}10518181\ x - 0{,}03889996$$

Somit ist der Extraktionsverlust E:

$$y_{Chlordiazepoxid} - y_{Zusatz}$$

$$E = 0{,}00691212\ x + 0{,}04083376$$

bb) Zusatzversuche mit 2-Amino-5-chlorbenzophenon zu Rinderserum (Diazotierungsmethode)

Ausgehend von fünf methanolischen Stammlösungen, die 1000 gamma ACB/ml enthielten, wurden je 10 Standardlösungen - halb Methanol, halb Wasser - mit 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2 gamma/ml hergestellt. Von diesen Lösungen wurden immer 1 ml zu 4 ml Rinderserum zugesetzt und mit diesem gut vermischt. Schließlich wurde das Serum mit 3 ml Wasser verdünnt und danach mit 10 %iger Natronlauge auf ein pH von 10 bis 11 eingestellt. Anschließend wurde dreimal fünf Minuten mit Äther extrahiert - wobei ebenso wie bei der Reextraktionsmethode (D ba) darauf zu achten war, einen möglichst reinen Ätherextrakt zu erhalten. Die

gesammelten Ätherphasen wurden noch mit Wasser zweimal ausgewaschen und dann über Natriumsulfat getrocknet. Der auf dem Wasserbad eingeengte Ätherextrakt wurde in ein ADH-Röhrchen gegeben und dort mit 1 ml 6 n Salzsäure unterschichtet. Nach Abdampfen der Ätherphase wurden die Röhrchen gut umgeschüttelt und danach fünf Minuten lang zentrifugiert. Mit einer Pipette wurde nun vorsichtig die obere Schicht durchstoßen, 0.5 ml der Säure aufgenommen und zur Diazotierung in ein zweites ADH-Röhrchen gegeben, in dem sich bereits 1 ml destilliertes Wasser befand. Dieser Gang erwies sich als notwendig, um für den Diazotierungsvorgang eine möglichst klare Ausgangslösung zu gewinnen. Durch Halbierung des Volumens war es außerdem möglich, den Verlust auszuschließen, der dann eintritt, wenn die Säurephase gekocht werden muß, sofern Reinsubstanz und andere Metaboliten vorliegen. Selbst nach mehrmaligem Spülen mit Chromschwefelsäure konnte nämlich nicht verhindert werden, daß Teile der Säure an der Wandung des Kühlersystems hängen blieben. Nunmehr wurden 0.5 ml einer frisch angesetzten, 0.1 %igen Natriumnitritlösung hinzugefügt, gut geschüttelt, nach 3 Minuten 0.5 ml einer frisch angesetzten 0.5 %igen Ammoniumsulfamatlösung und schließlich 10 Minuten später nach erneutem Umschütteln 0.5 ml einer frisch angesetzten 0.1 %igen Lösung von N(1-Naphthyl)-äthylendiamindihydrochlorid zugegeben.

Die spektrophotometrische Messung des entstehenden Farbstoffes erfolgte nach weiteren 10 Minuten im Beckman-Spektrophotometer ab einer Wellenlänge von 650 nm. Die Vergleichsküvette enthielt dabei stets einen kurz zuvor gewonnenen Leerextrakt, der auf dieselbe Weise aufgearbeitet wurde. Insgesamt wurden für die

Konzentrationen von 1 bis 10 gamma ACB je 5 Zusatzversuche - also 50 Arbeitsgänge vorgenommen. Die gefundenen Extinktionswerte sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Eichkurve der Serumzusatzversuche mit 2-Amino-5-chlorbenzophenon:

$b = + 0{,}04695757$ $\quad s = \pm 0{,}04764567$

$a = + 0{,}00113336$ $\quad s_b = \pm 0{,}00234591$

$$s_a = \pm 0{,}01455599$$

Somit lauten die Regressionsgerade

$$y = 0{,}04695757\ x + 0{,}00113336$$

und die Regressionsgeraden der Standardabweichungen

$$y_1 = 0{,}04930348\ x + 0{,}01568935$$

$$y_2 = 0{,}04461166\ x - 0{,}01342263$$

Es erfolgte ferner die Berechnung der Regressionsgeraden der Zusatzversuche sowie der Regressionsgeraden der dazugehörigen Standardabweichungen. Die graphische Darstellung zeigt die Abbildung 14. In Tabelle 7 wurden die Mittelwerte und deren Standardabweichungen für die Messungen in den einzelnen Konzentrationsbereichen eingefügt. Schließlich wurde mit Hilfe der bei der Regressionsberechnung zur Eichkurve des 2-Amino-5-chlorbenzophenons erhaltenen Werte die mittlere Extraktionsausbeute bestimmt sowie der Extraktionsverlust in Form einer mathematischen Gleichung angegeben.

Mittlere Extraktionsausbeute:

Der Mittelwert aller gefundenen Extinktionswerte des ACB beträgt $\bar{y}_{ACB} = 0.2928$.

Der Mittelwert aller gefundenen Extinktionswerte nach Zusatz des ACB beträgt $\bar{y}_{Zusatz} = 0.2594$.

Somit gilt:

$$\text{Extraktionsausbeute} = \frac{100 \cdot \bar{y}_{Zusatz}}{\bar{y}_{ACB}} \ \%$$

$$\frac{100 \cdot 0.2594}{0.2928} = 88.5 \ \%$$

Extraktionsverlust:

Die Regressionsgerade des ACB lautet:

$$y_{ACB} = 0.05530909 \ x - 0.0114$$

Die Regressionsgerade der Zusatzversuche mit ACB lautet:

$$y_{Zusatz} = 0.04695757 \ x + 0.00113336$$

somit ist der Extraktionsverlust E:

$$y_{ACB} - y_{Zusatz}$$

$$E = 0.00835152 \ x - 0.01253336$$

Anzahl der Messungen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.040	0.090	0.140	0.145	0.250	0.270	0.335	0.365	0.400	0.370
2	0.035	0.085	0.120	0.050	0.130	0.240	0.300	0.380	0.365	0.365
3	0.060	0.095	0.145	0.190	0.230	0.300	0.345	0.345	0.425	0.415
4	0.050	0.105	0.165	0.210	0.270	0.295	0.360	0.405	0.470	0.515
5	0.045	0.110	0.170	0.230	0.295	0.350	0.385	0.440	0.515	0.560
y_{gesamt}	0.230	0.485	0.740	0.825	1.175	1.455	1.725	1.935	2.175	2.225
$\bar{y}$	0.046	0.097	0.148	0.165	0.235	0.291	0.345	0.387	0.435	0.445
$s_y \pm$	0.0086	0.0093	0.0181	0.0640	0.0567	0.0364	0.0281	0.0330	0.0526	0.0788

Tabelle 7: Zusatzversuche von ACB zu Rinderserum,
Extinktionswerte des nach der Bratton-Marshall-Reaktion bestimmten
2-Amino-5-chlorbenzophenon

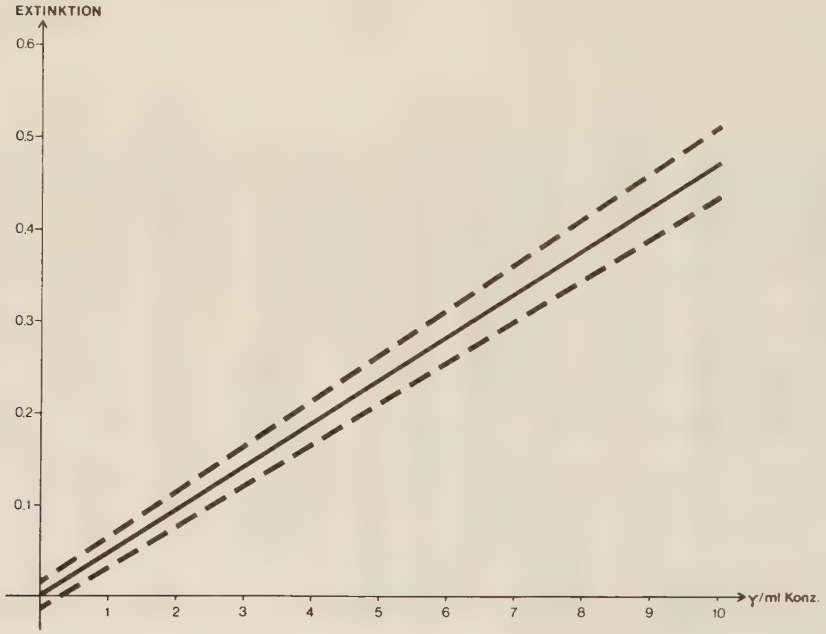


Abb. 14: Regressionsgerade und Regressionsgeraden der Standardabweichungen des nach Bratton und Marshall diazotierten 2-Amino-5-chlorbenzophenon nach Zusatz und Wiedergewinnung aus Rinderserum

E. Pharmakokinetik

Verlauf der Blutserumkonzentration von Chlordiazepoxid nach Einnahme verschieden hoher Dosen von Chlordiazepoxid-Base:

1. Versuchsmodell:

Drei verschieden gesunden Versuchspersonen, von denen bekannt war, daß sie in letzter Zeit keinerlei Medikamente zu sich genommen hatten und die nachweislich unter keiner ernstlichen inneren Erkrankung litten, wurde morgens um 07.45 Uhr Blut abgenommen und der Blutdruck gemessen. Weiterhin wurden sie nach ihrem subjektiven Befinden befragt. Um 08.00 Uhr bekamen die Probanden eine unterschiedlich hohe einmalige Dosis an Chlordiazepoxid - in Form der Librium-Dragees (5 bzw. 25 mg) - verabreicht. Es wurde dann stündlich Blut mit Hilfe einer Verweilkanüle - am ersten Tag 11 Proben - entnommen, so daß also die letzte Blutentnahme abends um 19.00 Uhr stattfand. Weitere Blutentnahmen erfolgten nach der 24., 48. und 72. Stunde, bei einem Versuch auch 32 Stunden nach der Chlordiazepoxid-Einnahme. Die gewonnenen Blutproben wurden nach dem Erkalten 10 Minuten lang zentrifugiert und anschließend das überstehende Serum vom Blutkuchen abpipettiert und im Kühlschrank aufbewahrt.

a) 1. Hauptversuch: 24. 11. 1969

männliche Versuchsperson (S.H.), 26 Jahre alt, 70 kg schwer.
Verabreichte Dosis: 4 Dragees Librium 25, das heißt also eine einmalige Einnahme von 100 mg

7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxid (Libriumbase).
Blutdruck vor Versuchsbeginn: 135/85
Blutdruck 5 Stunden nach Einnahme: 120/80
Blutdruck 11 Stunden nach Einnahme: 120/80
Subjektiv wurde keine Müdigkeit empfunden. Deutlich auffallend war eine gewisse Euphorie.

b) 2. Hauptversuch: 27. 12. 1969

männliche Versuchsperson (P.U.), 26 Jahre alt, 85 kg schwer.
Verabreichte Dosis: 2 Dragees Librium 25, also 50 mg Libriumbase.
Blutdruck vor Versuchsgebinn: 130/90
Blutdruck 5 Stunden nach Einnahme: 115/80
Blutdruck 11 Stunden nach Einnahme: 130/90
Subjektiv keine Müdigkeit.

c) 3. Hauptversuch: 27. 12. 1969

männliche Versuchsperson (W.M.), 24 Jahre alt, 80 kg schwer.
Verabreichte Dosis 1 Dragee Librium 25 und 1 Dragee Librium 5, also 30 mg Libriumbase.
Blutdruck vor Versuchsbeginn: 115/70
Blutdruck 5 Stunden nach der Einnahme: 110/80
Blutdruck 11 Stunden nach der Einnahme: 115/70
Auch hier wurde subjektiv keine Müdigkeit verspürt.

2. Auswertung der Seren

a) Methode I: Serumspiegel von Chlordiazepoxid-Reinsubstanz (Reextraktionsmethode)

Je nach dem zu erwartenden Gehalt an Chlordiazep-

oxid-Base wurden unterschiedliche Serummengen (von 2 bis 11 ml) so aufgearbeitet, wie es im Abschnitt "Extraktionsversuche 1" (D ba) beschrieben wurde. Das alkalisch gemachte Blutserum wurde mehrmals mit destilliertem Diäthyläther extrahiert und die saubere, über geglühtem Natriumsulfat getrocknete Ätherphase mit 2 n Schwefelsäure reextrahiert; anschließend erfolgte sofortige photometrische Messung des Säurereextraktes. Die Messung erfolgte gegen einen möglichst nicht zu alten, entsprechend gewonnenen Reextrakt einer Serumleerprobe.

Die gefundenen Extinktionswerte wurden nun in die Gleichung der bei den Serumzusatzversuchen mit Chlordiazepoxid-Reinsubstanz erhaltenen Regressionsgeraden eingesetzt, um somit die gemessenen Konzentrationen zu bestimmen. Dieser Wert mußte noch durch die untersuchte Serummenge dividiert werden, um die Chlordiazepoxidkonzentration pro ml Serum zu erhalten. Die methodische Streuung wurde dadurch erfaßt, daß die Extinktionswerte noch in die zugehörigen Gleichungen der Regressionsgeraden der Standardabweichungen eingesetzt wurden. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 8 numerisch und in den Abbildungen 15 bis 17 graphisch dargestellt.

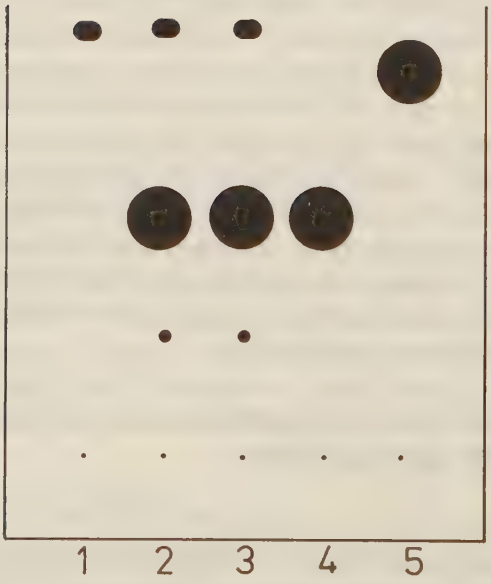
aa) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zur Identifizierung

Zur weiteren Identifizierung der auf diese Weise bestimmten Chlordiazepoxid-Base wurde im folgenden noch ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt, das

1. Rückstand des Ätherextraktes einer Serumleerprobe in Methanol gelöst

2. Rückstand des Ätherextraktes eines 5-Stunden-Wertes nach der Einnahme von Chlordiazepoxid in Methanol gelöst

3. Säurereextrakt eines 5-Stunden-Wertes, erneut alkalisch gemacht und nochmals mit destilliertem Diäthyläther mehrmals extrahiert. Der Äther wurde abgedampft, der Rückstand in Methanol gelöst und aufgetragen



4. Reinsubstanz der Chlordiazepoxid-Base in Methanol gelöst

5. Reinsubstanz des 2-Amino-5-chlorbenzophenons in Methanol gelöst

enthielt. Als Fließmittel diente Chloroform/Methanol (95:5). Die Laufzeit betrug 40 Minuten.

Bei Betrachten des Chromatogramms im UV-Licht der Wellenlänge 254 nm zeigte sich bei 2 und 3 in einem Rf-Bereich von 0.5 bis 0.6 ein intensiv dunkler Fleck auf hellem Untergrund (Prinzip der Fluoreszenzlöschung). Eine Absorption in demselben Rf-Bereich zeigte die ebenfalls aufgetragene Chlordiazepoxid-Reinsubstanz (Kontrolle). Im weiteren fand sich eine äußerst geringe Absorption in einem Rf-Bereich von 0.3 sowohl bei 2 als auch bei 3. Es mußte sich dabei um einen in minimaler Konzentration vorhandenen Metaboliten handeln, der sich - ebenso wie die Reinsubstanz - mit Äther aus alkalischem Milieu extrahieren und aus der Ätherphase mit 2 n Schwefelsäure reextrahieren ließ.

Um zu prüfen, ob eine Änderung in der Konzentration des Metaboliten eingetreten war, wurden die Säure-Reextrakte der Blutproben aller drei Versuchspersonen der 3., 7., 11., 24. und 48. Stunde nach der Applikation wieder alkalisch gemacht und erneut mit Äther extrahiert. Die Rückstände der eingedampften Ätherphasen wurden dann in Methanol gelöst und auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen.

Stunden nach Applikation	gamma/ml Serum nach Einnahme von 30 mg		50 mg		100 mg	
Kontrolle	0		0		0	
1. Stunde	0.47	0.44 0.50	2.57	2.48 2.66	4.26	4.13 4.39
2. Stunde	1.45	1.40 1.50	2.47	2.39 2.55	5.48	5.34 5.62
3. Stunde	1.26	1.21 1.31	2.39	2.31 2.47	5.06	4.92 5.20
4. Stunde	1.23	1.19 1.27	2.46	2.38 2.54	4.84	4.71 4.97
5. Stunde	1.08	1.03 1.13	2.63	2.55 2.71	4.57	4.44 4.70
6. Stunde	1.35	1.30 1.40	2.49	2.41 2.57	4.15	4.03 4.27
7. Stunde	1.19	1.14 1.24	2.06	1.98 2.14	4.00	3.88 4.12
8. Stunde	0.93	0.88 0.98	1.89	1.82 1.96	4.63	4.50 4.76
9. Stunde	0.98	0.93 1.03	1.83	1.76 1.90	4.40	4.28 4.52
10. Stunde	0.81	0.77 0.85	1.68	1.61 1.75	4.26	4.14 4.38
11. Stunde	0.66	0.62 0.70	1.46	1.39 1.53	4.10	3.98 4.22
24. Stunde	0.51	0.49 0.53	0.97	0.93 1.01	2.16	2.08 2.24
32. Stunde	.	.	.	.	1.96	1.90 2.02
48. Stunde	0.23	0.22 0.24	0.43	0.41 0.45	1.23	1.18 1.28
72. Stunde	0.06	0.05 0.07	0.09	0.08 0.10	0.46	0.43 0.49

Tabelle 8: Konzentration an Chlordiazepoxid-Reinsubstanz im Blutserum nach verschiedenen Zeiten

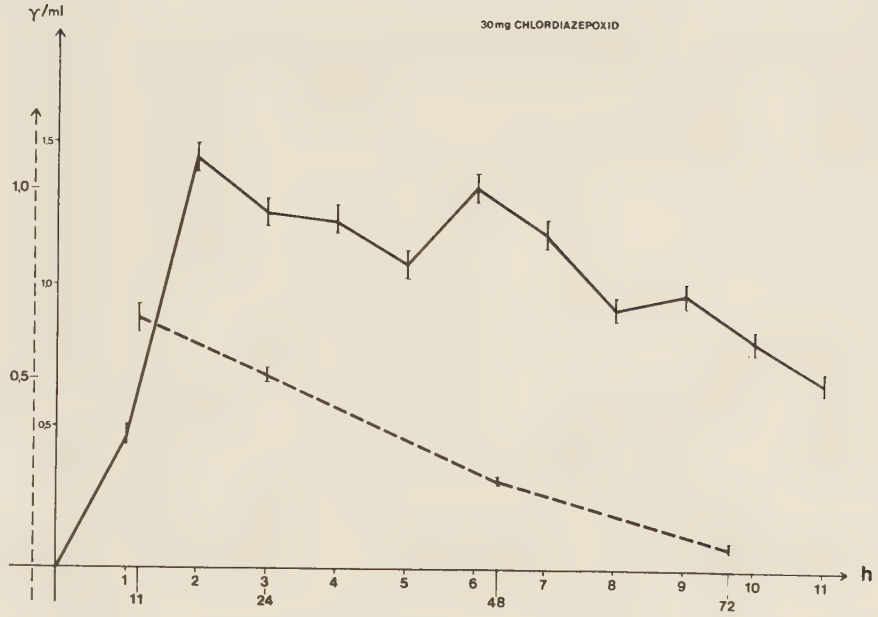


Abb. 15: Blutspiegelkurve nach einmaliger Gabe von 30 mg Chlordiazepoxid

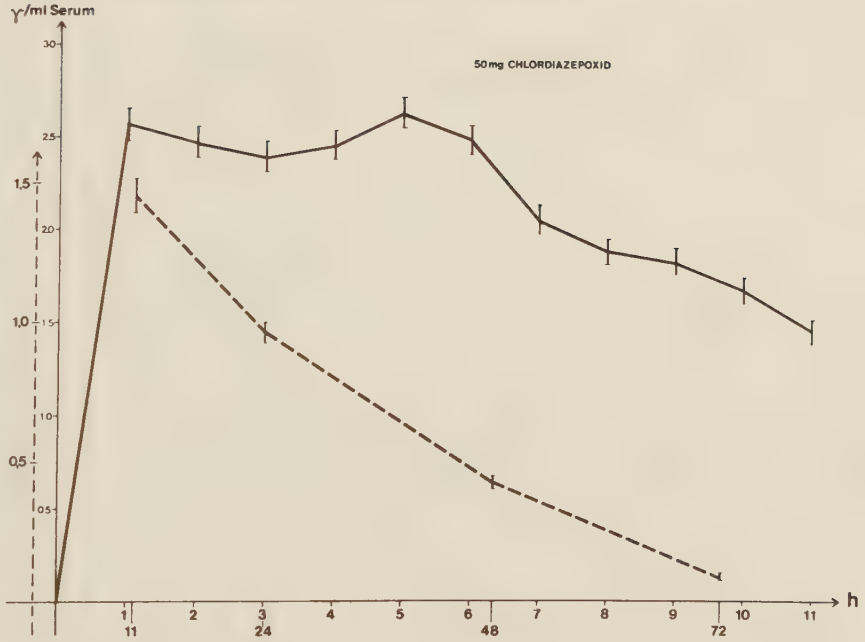


Abb.: 16: Blutspiegelkurve nach einmaliger Gabe von 50 mg Chlordiazepoxid

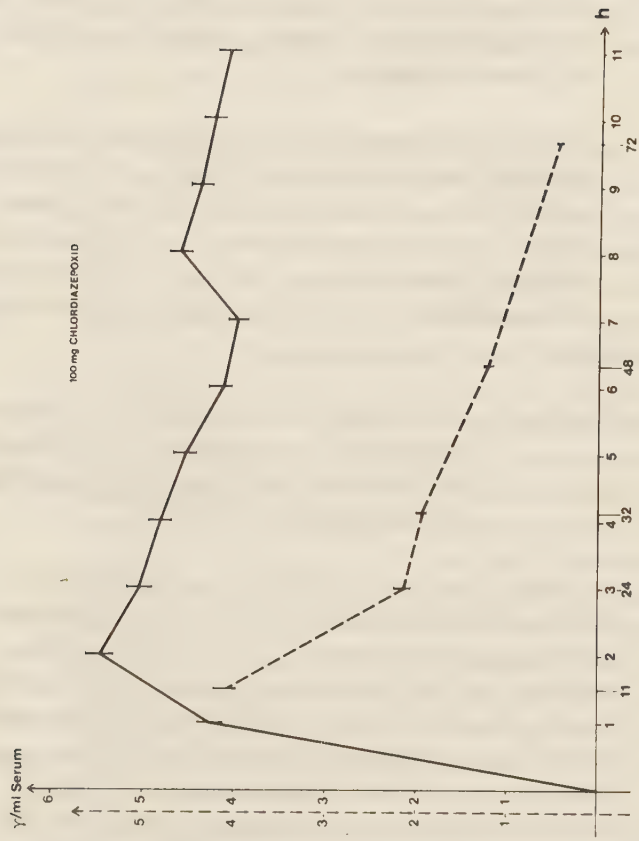


Abb.: 17: Blutspiegelkurve nach einmaliger Gabe von 100 mg Chlordiazepoxid

Dabei zeigte sich, daß in zunehmendem zeitlichen Abstand von der Applikation der anfänglich auf der Dünnschichtplatte kaum nachweisbare Metabolit an Konzentration zunahm. Da Reinsubstanzen von Metaboliten des Chlordiazepoxids nicht zur Verfügung standen, war es nicht möglich, diesen Metaboliten näher zu identifizieren.

Daß dieser Metabolit die spektrophotometrische Messung beeinflußt haben könnte, ist unwahrscheinlich, da die erhaltenen Kurven exakt - sowohl in der Form als auch in der Lage der Absorptionsmaxima und -minima - mit denen der Reinsubstanz von Chlordiazepoxid übereinstimmen.

b) Methode II: Bestimmung von unverändertem Chlordiazepoxid und ätherlöslichen Metaboliten nach der Diazotierungsmethode von BRATTON und MARSHALL

Zur Überprüfung der mit Hilfe der Methode I ermittelten Blutspiegelkurve, die nur unverändertes Chlordiazepoxid darstellt, wurde nun die Blutspiegelkurve für unverändertes und metabolisiertes Chlordiazepoxid bestimmt. Für Vergleichszwecke dienten die Serumproben des ersten Hauptversuches (Einnahme von 100 mg Chlordiazepoxid). Entsprechend dem bei den Serumzusatzversuchen mit 2-Amino-5-chlorbenzophenon beschriebenen Verfahren (D bb) wurden 2 ml Serum mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und mit einer 10 %igen Natronlauge auf ein pH von etwa 11 bis 12 gebracht. Nach dreimaliger Ätherextraktion, Nachwaschen, Trocknen der gesammelten Ätherextrakte und Ein-

engen der Ätherphase wurde dieselbe in einem ADH-Röhrchen mit 1 ml 6 n Salzsäure unterschichtet und der Äther vorsichtig abgedampft und nach Verschließen des Röhrchens kräftig umgeschüttelt, um an der Wand haftende Rückstände in die Säurephase zu überführen. Anschließend wurde das Gläschen an einen Rückflußkühler angeschlossen und in ein Paraffinbad gehängt.

Zür Hydrolyse der - nun in der Säurephase befindlichen - Chlordiazepoxid-Reinsubstanz und eventuell vorhandener Metaboliten wurde eine Stunde lang auf 125° (± 5°) erhitzt, um eine Überführung in das 2-Amino-5-chlorbenzophenon zu bewirken. Nach Abkühlung des Röhrcheninhaltes wurde 5 Minuten zentrifugiert, nach Durchstoßen der oberen Schicht 0.5 ml abpipettiert und in ein zweites ADH-Röhrchen, das 1 ml destilliertes Wasser enthielt, gebracht. Dort erfolgte die Diazotierung mit 0.5 ml 0.1 %iger Natriumnitritlösung, dessen Überschuß 3 Minuten später nach Zufügen von 0.5 ml 0.5 %iger Ammoniumsulfamatlösung gebunden wurde. Als Kupplungskomponente dienten wiederum 0.5 ml einer 0.1 %igen Lösung von N-(1-Naphthyl)äthylendiamindihydrochlorid, das nach 10 Minuten zugefügt wurde. Der sich entwickelnde Farbstoff konnte nach weiteren 10 Minuten spektrophotometrisch gemessen werden.

Die erhaltenen Extinktionswerte wurden nunmehr in die Gleichung der _ bei den Zusatzversuchen mit 2-Amino-5-chlorbenzophenon aufgestellten - Regressionsgeraden sowie in die Gleichungen der zugehörigen Regressionsgeraden der Standardabweichungen eingesetzt, um somit die gemessenen Kon-

zentrationen an ACB sowie die methodische Streuung zu bestimmen. Die in einem ml enthaltene Menge an Chlordiazepoxid-Reinsubstanz sowie an Metaboliten - gemessen über das diazotierbare ACB - wurde schließlich durch Division mit der untersuchten Serummenge erhalten. Diese Werte sind numerisch in Tabelle 9 und graphisch in Abbildung 18 dargestellt.

c) Methode III: Bestimmung von Chlordiazepoxid-Reinsubstanz über Säure-Reextraktion, Hydrolyse und Diazotierung nach BRATTON und MARSHALL

Alle Serumproben des 1. Hauptversuches wurden zusätzlich noch nach einem von SMYTH und PENNINGTON (1963) angegebenen und für die eigenen Untersuchungen etwas modifizierten Verfahren untersucht. Nach der üblichen Ätherextraktion und Vorreinigung wurde die Ätherphase mit 1 ml 6 n Salzsäure 10 Minuten ausgeschüttelt, um die Chlordiazepoxid-Reinsubstanz zu reextrahieren. Zur Hydrolyse wurde der Reextrakt 1 Stunde lang auf dem Paraffinbad bei 125° (± 5°) erhitzt. Anschließend erfolgte die übliche Diazotierung mit den BRATTON-MARSHALL-Reagenzien.

Im Gegensatz zur Methode I wurde also hier nicht der Reextrakt unmittelbar spektrophotometrisch gemessen, sondern der bei der Diazotierung des über Hydrolyse gewonnenen 2-Amino-5-chlorbenzophenons entstehende violette Farbstoff. Da hierbei die Fehlerbreite zweifellos größer ist als bei der im Prinzip gleichen Reextraktionsmethode, wurde dieses Verfahren nicht weiter verfolgt.

Stunden nach Applikation	gamma ACB/ml Serum 100 mg	
Kontrolle	0	
1. Stunde	5.30	4.94 5.66
2. Stunde	5.74	5.35 6.13
3. Stunde	6.25	5.85 6.70
4. Stunde	6.05	5.65 6.45
5. Stunde	4.99	4.64 5.34
6. Stunde	3.72	3.41 4.03
7. Stunde	4.04	3.72 4.36
8. Stunde	3.29	3.00 3.58
9. Stunde	4.35	4.03 4.67
10. Stunde	3.29	3.00 3.58
11. Stunde	3.39	3.10 3.68
24. Stunde	1.79	1.51 2.07
32. Stunde	1.50	1.35 1.65
48. Stunde	0.90	0.80 1.00

Tabelle 9: Serumkonzentration von Chlordiazepoxid und Metaboliten, bestimmt über das diazotierte 2-Amino-5-chlorbenzophenon

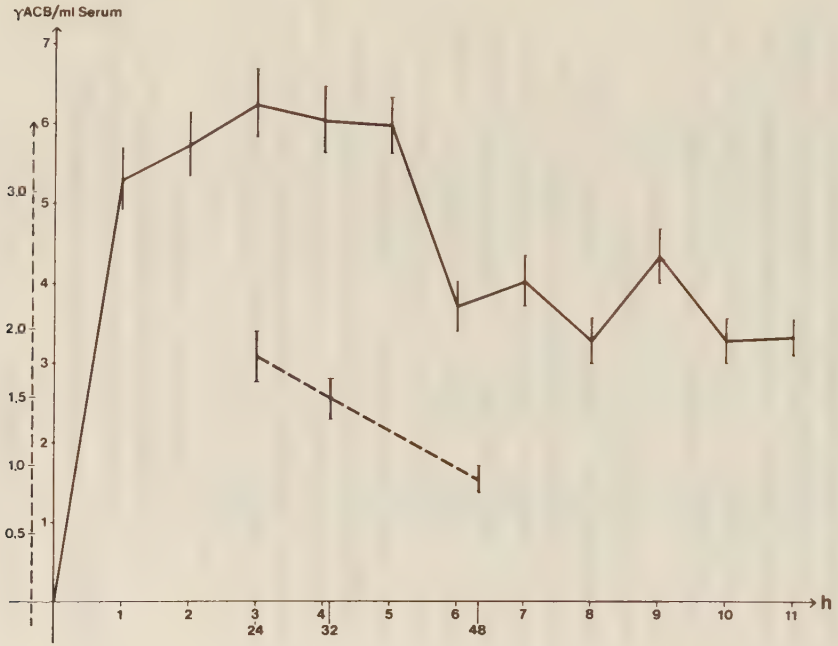


Abb.: 18: Blutspiegelkurve von Chlordiazepoxid und ätherlöslichen Metaboliten bestimmt über das diazotierte 2-Amino-5-chlorbenzophenon nach einmaliger Gabe von 100 mg Chlordiazepoxid

d) Aussage über das Ausmaß vorhandener Metaboliten von Chlordiazepoxid

Um die Ergebnisse der ersten und zweiten Methode bei der Auswertung der Seren nach Einnahme von 100 mg Chlordiazepoxid vergleichen zu können, ist es notwendig, die Ergebnisse der ersten Methode durch den Umwandlungsfaktor 1.29 zu dividieren. Dadurch ergeben sich die den erhaltenen Chlordiazepoxid-Konzentrationen äquivalenten Mengen an 2-Amino-5-chlorbenzophenon. Nur diese Zahlen können mit den bei der Methode II gefundenen Werten verglichen werden. Bildet man nun die Differenz zwischen den Benzophenon-Konzentrationen der Methode II (also Chlordiazepoxid und vorhandene Metaboliten) und den als Benzophenon-Konzentrationen angegebenen Chlordiazepoxid-Werten der Methode I, so stellt diese Differenz die zu dem jeweiligen Zeitpunkt vorhandene Menge an ätherlöslichen Metaboliten - ausgedrückt als Menge an diazotiertem 2-Amino-5-chlorbenzophenon - dar. Die Werte für den 1. Hauptversuch sind in Tabelle 10 dargestellt. Der Vergleich zeigt, daß bald nach der Einnahme von Chlordiazepoxid mehr ätherlösliche Metaboliten im Serum vorhanden sind als später. Man kann daher annehmen, daß ein Teil des applizierten Chlordiazepoxids rasch metabolisiert wird, und zwar in Form von ätherlöslichen Metaboliten. Die Tatsache, daß die Menge der im Serum anwesenden Metaboliten zu späteren Zeiten geringer wird und nicht zunimmt, wie man eigentlich erwartet hätte, läßt an eine Enzymsättigung oder Enzymerschöpfung der am Metabolismus beteiligten Reduktasen, Oxydasen und Hydrolasen denken (BEYER und SADEE, 1967). Die Elimination der

	Methode I Chlordiazepoxid Reinsubstanz	Methode II Chlordiazepoxid u.ätherlösliche Metaboliten	Differenz ätherlösliche Metaboliten
	gamma ACB/ml	gamma ACB/ml	gamma ACB/ml
1. Stunde	3.30	5.30	2.00
2. Stunde	4.24	5.74	1.50
3. Stunde	3.93	6.25	2.32
4. Stunde	3.75	6.05	2.30
5. Stunde	3.54	4.99	1.45
6. Stunde	3.22	3.72	0.50
7. Stunde	3.10	4.04	0.94
8. Stunde	3.59	3.29	.
9. Stunde	3.41	4.35	0.94
10. Stunde	3.30	3.29	.
11. Stunde	3.18	3.39	0.21
24. Stunde	1.67	1.79	0.12
32. Stunde	1.52	1.50	.
48. Stunde	0.96	0.90	.

Tabelle 10: Gegenüberstellung der nach Einnahme von 100 mg Chlordiazepoxid bestimmten Konzentration an Reinsubstanz und der Konzentration an Reinsubstanz und ätherlöslichen Metaboliten - angegeben als entsprechende Menge an 2-Amino-5-chlorbenzophenon. Ätherlösliche Metaboliten nach Einnahme von 100 mg Chlordiazepoxid

Metaboliten aus dem Serum muß also - jedenfalls nach den eigenen Ergebnissen - mit zunehmendem Abstand von der Einnahme in schnellerem Maße erfolgen als der weitere enzymatische Abbau von Chlordiazepoxid zu seinen Metaboliten. Dies wäre auch eine Erklärung für den in allen drei Hauptversuchen festgestellten langsamen Abfall des Chlordiazepoxidspiegels im Serum.

III. DISKUSSION

Der ärztlich verordnete, aber auch der ärztlich unkontrollierte Gebrauch von Psychopharmaka ist in den letzten Jahren zu einem Problem in der gutachterlichen Praxis der Gerichtlichen Medizin geworden. Sowohl bei der Begutachtung der Fahrtüchtigkeit als auch der strafrechtlichen Verantwortlichkeit wird von den Betroffenen eingewandt, sie hätten - gleich aus welchem Grunde - Psychopharmaka eingenommen. Obwohl zahlreiche Herstellerfirmen auf den Begleitzetteln der Original-Packungen auf die möglichen Nebenwirkungen hinweisen und vor dem Führen eines Kraftfahrzeuges im öffentlichen Straßenverkehr warnen, werden diese Hinweise nicht beachtet. Gleiches gilt für die Wechselwirkung mit Alkohol, sei es nun im Sinne eines positiven oder negativen Synergismus.

Aus der gutachterlichen Praxis der letzten Jahre ergibt sich die Forderung nach der Entwicklung geeigneter Nachweismethoden, die es erlauben, auch noch kleinste Arzneistoffdosen im Blut und Harn nachzuweisen; denn Blut und/oder Harn werden die Polizeibeamten asservieren, wenn der Verdacht einer die Fahr-

tüchtigkeit oder strafrechtliche Verantwortlichkeit beeinträchtigenden Arzneimittelwirkung besteht. Nur auf diesem Wege wird es dem Gutachter möglich sein, den gehegten Verdacht mit der nötigen Sicherheit zu bestätigen oder zu widerlegen.

Bei der Vielzahl der auf dem Markt befindlichen Psychopharmaka werden jedoch immense Anstrengungen erforderlich sein, um entsprechende Methoden zu entwickeln und mit Hilfe dieser Methoden den Verlauf der Blutspiegelkurven der unveränderten und metabolisierten Wirkstoffe zu erforschen. Denn nur unter diesen Voraussetzungen wird es gelingen, aus der Konzentration der unveränderten und metabolisierten Wirkstoffe Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der Einnahme und die Größe der eingenommenen Dosis eines bestimmten Wirkstoffes zu ziehen.

Im Hinblick darauf, daß die Benzodiazepine im Gebrauch weit verbreitet und in der Anzahl der einzelnen Wirkstoffe begrenzt sind - zur Zeit sind fünf Wirkstoffe, nämlich Chlordiazepoxid, Diazepam, Nitrazepam, Oxazepam und Medazepam im Handel und ein weiteres, nämlich Dikalium-Chlorazepat (Tranxilium ^{R}) in der klinischen Prüfung -, sollte zunächst Chlordiazepoxid geprüft werden.

Nach den bisher üblichen Methoden wurde Chlordiazepoxid aus Blut oder Harn nach der von BÄUMLER und RIPPSTEIN (1961) sowie von KAMM und BAIER (1969) angegebenen Methode durch saure Hydrolyse in das 2-Amino-5-chlorbenzophenon überführt, dieses mit Äther im alkalischen Milieu extrahiert, der eingedampfte Ätherrückstand chromatographisch identifiziert und mit entsprechenden Methoden grob quantitativ gemessen. Etwas genauer ist

die von PRIBILLA (1964) angegebene kombinierte dünnschichtchromatographisch-spektrophotometrische Methode. Hier erfolgt nach saurer Hydrolyse zum 2-Amino-5-chlorbenzophenon und chromatographischer Identifizierung die Diazotierung auf dem Dünnschichtchromatogramm, anschließend die Elution der Substanzflecken und die Photometrie der entstehenden Farbstofflösungen. Ein entsprechendes Verfahren wird von KAMM und KELM (1969) zum Nachweis von Oxazepam angegeben, das zum gleichen Hydrolyseprodukt wie Chlordiazepoxid überführt werden kann. BEYER und SADEE (1969) gaben eine quantitative spektrophotometrische Methode zum Nachweis von Nitrazepam an; auch diese Methode beruht auf der Hydrolyse zu den 2-Amino-benzophenonderivaten - in diesem Falle dem 2-Amino-5-nitrobenzophenon.

Im Schrifttum der letzten Jahre finden sich einschlägige Untersuchungen über die Pharmakokinetik von Chlordiazepoxid von KOECHLIN und D'ARCONTE (1963), sowie von SMYTH und PENNINGTON (1963). Die ersten Untersucher führten Chlordiazepoxid nach Ätherextraktion mit Hilfe eines Glyzin/Salzsäure-Puffers von pH 4,8 in das Lactam über, das nach Lichtexposition eine charakteristische Fluoreszenz in alkalischem Milieu aussendet und somit spektrofluorimetrisch gemessen werden kann. SMYTH und PENNINGTON extrahierten mit Chloroform aus alkalischem Milieu, reextrahierten mit 6 n Salzsäure, hydrolysierten das Chlordiazepoxid zum 2-Amino-5-chlorbenzophenon und schlossen nach der Diazotierung die spektrophotometrische Messung an.

Aus dem übersehbaren Schrifttum ergeben sich keine ausreichenden Hinweise auf die quantitative Ausbeute, seien es zum Beispiel Extraktionsverluste oder seien es Verluste infolge unvollständiger Überführung des

unveränderten und gegebenenfalls metabolisierten Wirkstoffs in das 2-Amino-5-chlorbenzophenon. Für die eigenen Untersuchungen wurden deshalb die teilweise im Schrifttum bekannten chemischen und physikalischen Daten des Chlordiazepoxids und des 2-Amino-5-chlorbenzophenons überprüft, um diese oder jene Eigenschaft für den Nachweis kleinster Wirkstoffmengen im Serum heranziehen zu können.

Nach umfangreichen Vorarbeiten wurden mehrere Methoden zum quantitativen Nachweis größerer Mengen von unverändertem Chlordiazepoxid oder von 2-Amino-5-chlorbenzophenon entwickelt. Einmal handelte es sich um eine kombinierte säulenchromatographisch-spektrophotometrische Methode zur Isolierung von 2-Amino-5-chlorbenzophenon aus Serum, zum anderen um kombinierte dünnschichtchromatographisch-spektrophotometrische Methoden zum Nachweis sowohl von unverändertem Chlordiazepoxid als auch von 2-Amino-5-chlorbenzophenon. Diese Verfahren waren jedoch, da sie mit einem relativ großen Verlust behaftet waren, für die quantitative Bestimmung kleiner Wirkstoffmengen ungeeignet. Zu diesem Zweck wurden zwei weitere Methoden erarbeitet und für die späteren pharmakokinetischen Untersuchungen verwendet. Im ersten Fall wurde das unveränderte, im zweiten Fall das in das 2-Amino-5-chlorbenzophenon überführte Chlordiazepoxid und dessen Metaboliten gemessen.

Von wesentlicher Bedeutung war die Frage, in welchem Maße unverändertes Chlordiazepoxid aus Serum zu extrahieren ist, denn hierüber weist das überblickbare Schrifttum keine ausreichenden Angaben auf. Bei Extraktionsversuchen aus mit Perchlorsäure gefällten Seren ergab sich eine Ausbeute von etwa 80 bis 85 %.

Als bessere Methode bot sich nun die dreimalige Extraktion des ungefällten Serums nach Alkalisierung (pH 11 bis 12) mit destilliertem Äther an, zur Reextraktion wurde 2 n Schwefelsäure verwendet. Hier konnten Ausbeuten von 87 % durch zahlreiche Versuche exakt bestimmt werden. Wird also mit Hilfe dieser Methode eine bestimmte Konzentration gemessen, so müßte dieser Wert für die forensische Fragestellung mit dem Faktor 1,15 multipliziert werden, um den wahren Gehalt im Serum anzugeben. Die Ausbeute war geringgradig größer, wenn reines 2-Amino-5-chlorbenzophenon dem Serum zugesetzt wurde. Sie betrug 88,5 %.

Aufgrund umfangreicher Messungen im UV-Bereich wurden für das unveränderte Chlordiazepoxid Eichkurven im neutralen, alkalischen und sauren Milieu für den Konzentrationsbereich von 1 bis 10 gamma/ml aufgestellt und die Regressionsgeraden der Standardabweichungen berechnet. Der methodische Fehler beträgt etwa 5 %. Für die zweite Methode wurde nach Diazotierung des reinen 2-Amino-5-chlorbenzophenons ein etwas größerer methodischer Fehler ermittelt. Schließlich konnte gezeigt werden daß die Überführung von Chlordiazepoxid in das 2-Amino-5-chlorbenzophenon durch salzsäure Hydrolyse unvollständig ist, wenn die Hydrolyse auf dem Wasserbad erfolgt. Auf diese Weise werden nur etwa 60 bis 70 % des Chlordiazepoxids in das 2-Amino-5-chlorbenzophenon überführt. Vollständig ist dagegen die Überführung in das Benzophenon, wenn Chlordiazepoxid am Rückflußkühler eine Stunde bei 125°C ($\pm$ 5°C) hydrolysiert wird.

Nachdem nun diese methodischen Voraussetzungen geschaffen und geprüft worden waren, wurden an drei Versuchspersonen, die frühmorgens Dosen von 30, 50 und

100 mg Chlordiazepoxid in Form von Librium-Dragees oral erhalten hatten, die Blutspiegelkurven für das reine Chlordiazepoxid sowie bei einem Probanden für Chlordiazepoxid und dessen Metaboliten nach Überführung in das diazotierbare 2-Amino-5-chlorbenzophenon gemessen. Die Untersuchungen erstreckten sich auf insgesamt 72 Stunden ab Einnahme des Chlordiazepoxids, wobei am ersten Tag der Verlauf des Blutspiegels über 11 Stunden durch stündliche Blutentnahme kontrolliert wurde.

Eine 5 Stunden nach der Applikation ausgeführte Blutdruck-Kontrolle ergab bei 2 Versuchspersonen (Einnahme 50 und 100 mg Librium) einen systolischen Blutdruckabfall von 15 mm Hg gegenüber den Ausgangswerten; bei der dritten Versuchsperson mit 30 mg Librium fiel der systolische Blutdruck nur um 5 mm Hg ab. Subjektiv wurde keine Müdigkeit verspürt, was sich mit den von WALSEN (1961) und anderen beschriebenen Beobachtungen deckt. Demnach soll sich als häufigste Begleiterscheinung nach Einnahme von Chlordiazepoxid eine erhöhte Schlafbereitschaft erst bei Untätigkeit und Bettruhe geltend machen. Sind die Patienten dagegen tätig, werde Aufmerksamkeit und Bewußtsein nicht beeinträchtigt (GARRONE und DICK, 1960). Weiterhin fiel eine gewisse euphorische Stimmungslage auf.

Bei allen drei Versuchspersonen erfolgte ein rascher Anstieg des Chlordiazepoxidspiegels im Serum. Nach Einnahme von 100 mg Chlordiazepoxid wurde der höchste Blutspiegel nach zwei Stunden mit 5.48 gamma/ml erreicht. Anschließend erfolgte ein flacher Abfall, in der achten Stunde ein erneuter Anstieg auf 4.63 gamma/ml und danach wiederum ein flacher Abfall. Nach der 11. Stunde wurden 4.1 gamma/ml und nach 72 Stunden noch 0.46 gamma/ml nachgewiesen. Bei der Einnahme von

50 mg Chlordiazepoxid erreichte der Blutspiegel sein erstes Maximum mit 2.47 gamma/ml ebenfalls nach der zweiten Stunde und das zweite, bereits in der vierten Stunde beginnend, nach der fünften Stunde. Dieser Gipfel lag mit 2.63 gamma/ml deutlich über dem der zweiten Stunde. Anschließend begann der Blutspiegel langsam abzusinken. Er wies nach 11 Stunden 1.46 gamma/ml und nach 72 Stunden noch rund 0.09 gamma/ml auf. Auch nach Einnahme von 30 mg Chlordiazepoxid zeigten sich zwei Maxima, das erste wiederum nach zwei Stunden mit 1.45 gamma/ml, das zweite nach einem flachen Abfall des Blutspiegels bis zur fünften Stunde in der sechsten Stunde mit 1.35 gamma/ml. Schließlich fand sich nach einem flachen Abfall ein erneuter Anstieg auf 0.98 gamma/ml nach der neunten Stunde. Nach 11 Stunden war noch ein Blutspiegel von 0.66 gamma/ml, nach 72 Stunden ein solcher von 0.06 gamma/ml nachweisbar.

Auffallend sind also bei allen drei Versuchen zwei Maxima. Das erste tritt eine bis zwei Stunden nach der Gabe von Chlordiazepoxid auf. Ob die zeitliche Lage des ersten Gipfels ebenso wie bei der Alkoholbelastung abhängig ist von der zugeführten Dosis (KRAULAND, WOJAHN und GLASS, 1966), läßt sich aufgrund der drei Versuche nicht mit der nötigen Sicherheit sagen, da der Gipfel bei 50 mg Chlordiazepoxid nach einer Stunde erreicht wurde, während er nach Gabe von 30 bis 100 mg erst nach zwei Stunden erschien. Zur Beantwortung dieser Frage werden also weitere Untersuchungen erforderlich sein.

Eine Deutung des zweiten Gipfels könnte, ähnlich wie bei Barbituraten, durch zeitweilige Speicherung von Chlordiazepoxid im Fettgewebe möglich sein (GOODMAN

und GILMAN, 1965). Allerdings liegen entsprechende Untersuchungsergebnisse bisher nicht vor. RIEDER und RENTSCH (1968) vertreten die Meinung, daß das Vorkommen eines zeitweiligen Wiederanstiegs der Werte als die Folge einer zweiten Resorption von Chlordiazepoxid nach vorheriger Sekretion in der Galle gedeutet werden kann (entero-hepatischer Kreislauf). Auch dürften nach ihrer Meinung Substanzverschiebungen zwischen verschiedenen Räumen des Organismus eine Rolle spielen.

Vergleicht man nun die von KOECHLIN und D'ARCONTE (1963) sowie die von SMYTH and PENNINGTON (1963) mit Hilfe anderer mikrochemischer Methoden gewonnenen Ergebnisse nach Einnahme von 30 bzw. 100 mg Chlordiazepoxid in bezug auf die Blutspiegelhöhe des Chlordiazepoxids mit den hier erzielten Werten, so zeigt sich eine gute Übereinstimmung. KOECHLIN und D'ARCONTE erhielten nach Einnahme einer Dosis von 30 mg Chlordiazepoxid die höchsten Serumspiegel zwei bis vier Stunden nach der Applikation in einer Höhe von 1.3 bis 2 gamma/ml. Bei den eigenen Versuchen stellte sich das Maximum der Blutspiegelkonzentration nach der zweiten Stunde mit 1.45 gamma/ml ein. SMYTH und PENNINGTON fanden bei neun Versuchspersonen, denen 100 mg Chlordiazepoxid appliziert worden waren, nach drei Stunden eine höchste mittlere Konzentration von 5 gamma/ml. Nach 24, 48 und 72 Stunden fanden sie im Mittel noch 2.33, 0.91 und 0.52 gamma/ml. Auch diese Ergebnisse stimmen gut mit denen der in dieser Arbeit aufgezeigten Methode überein, denn nach Einnahme von 100 mg Chlordiazepoxid betrug der höchste Serumspiegel 5.48 gamma/ml nach zwei Stunden, während nach 24, 48 und 72 Stunden noch 2.16, 1.23 und 0.46 gamma/ml nachzuweisen waren.

Nach allgemeinen pharmakokinetischen Erfahrungen wäre an sich ein exponentieller Verlauf der Blutspiegelkurve von Chlordiazepoxid zu erwarten gewesen. Diese Erwartung trifft jedoch - allerdings nur auf die drei eigenen Versuche gestützt sowie nach den bei ähnlichen pharmakokinetischen Versuchen mit Chlordiazepoxid gewonnenen Ergebnissen von SMYTH and PENNINGTON sowie von KOECHLIN und D'ARCONTE - nicht zu. Zu ähnlichen Ergebnissen kamer ferner PELZER und MAASS (1969) sowie KAMM und KELM (1969) bei pharmakokinetischen Untersuchungen mit Oxazepam; auch KOHLER (1970) erzielte bei seinen Untersuchungen über Blutspiegelkurven von Medazepam ähnliche Ergebnisse. Im Gegensatz hierzu deuten RIEDER und RENTSCH (1968) einen exponentiellen Ablauf der Elimination von Medazepam an. Auch zur Beantwortung dieser Fragen werden weitere Untersuchungen erforderlich sein.

Ebenso weist die Blutspiegelkurve von Chlordiazepoxid und ätherlöslichen Metaboliten nach Einnahme von 100 mg Wirkstoff - bestimmt über das diazotierte 2-Amino-5-chlorbenzophenon - einen raschen Anstieg auf, so daß nach der dritten Stunde das erste Maximum mit 6.25 gamma/ml erreicht ist. Weitere Maxima stellen sich in der siebenten, neunten und der elften Stunde ein. Auch hier ist zwischen den einzelnen Maxima ein flacher Konzentrationsabfall zu beobachten. Mit dieser Methode ließen sich nach 24 Stunden 1.79 gamma/ml, nach 32 Stunden 1.49 und nach 48 Stunden noch 0.9 gamma/ml nachweisen.

Aus den Ergebnissen der nach Methode II bestimmten Konzentration von Chlordiazepoxid und seinen ätherlöslichen Metaboliten - bestimmt über das diazotierte 2-Amino-5-chlorbenzophenon - und jenen der nach Methode

I bestimmten Konzentrationen an unverändertem Chlordiazepoxid wurden - nach Division der Chlordiazepoxid-Konzentrationen durch den Umwandlungsfaktor 1.29 - die Differenzen gebildet. Somit ergeben sich Blutspiegelwerte der zu dem jeweiligen Zeitpunkt vorhandenen Menge an ätherlöslichen Metaboliten, gemessen als diazotiertes 2-Amino-5-chlorbenzophenon. Auch hier war ein steiler Anstieg zu beobachten mit einem Maximum in Höhe von 2.32 gamma ACB/ml in der dritten Stunde.

Wider Erwarten ist die Menge der Metaboliten zu späteren Zeiten geringer, so daß man eine Enzymsättigung oder Enzymerschöpfung der am Metabolismus beteiligten Enzyme in Erwägung ziehen muß. Die Elimination der Metaboliten aus dem Serum würde demnach schneller erfolgen als der weitere enzymatische Abbau von Chlordiazepoxid zu seinen Metaboliten, da die erneute Bereitstellung der Enzyme langsamer erfolgt.

Diese Deutung steht scheinbar im Widerspruch zu den Ergebnissen, die nach dünnschichtchromatographischen Untersuchungen der erneut alkalisierten und ausgeätherten Reextrakte gewonnen wurden. Dabei zeigte sich im Fließmittel Chloroform/Methanol (95:5) in einem Rf-Bereich von 0.3 ein anfänglich kaum nachweisbarer Stoff, der jedoch in den später entnommenen Blutproben an Konzentration zunahm. Selbst wenn es sich dabei tatsächlich um einen Metaboliten von Chlordiazepoxid handeln sollte, kann es dennoch möglich sein, daß die Metaboliten in der Gesamtheit abnehmen, da zweifellos nicht alle Metaboliten, die bei der Methode II bestimmt wurden, durch die Reextraktion erfaßbar sind.

Ob es sich nun bei der auf den Dünnschichtchromatogrammen nachgewiesenen Substanz in einem Rf-Bereich

von 0.3 um einen Metaboliten von Chlordiazepoxid handelt, konnte nicht näher bewiesen werden, da Reinsubstanzen der Metaboliten von Chlordiazepoxid nicht zur Verfügung standen. Daß durch diesen Stoff eine Beeinflussung der UV-Messungen eingetreten sein könnte, lag nicht nahe, da die erhaltenen UV-Kurven sowohl in Form als auch in den Absorptionsmaxima und -minima exakt mit denen der Chlordiazepoxid-Reinsubstanz übereinstimmten. Außerdem sei erwähnt, daß SMYTH and PENNINGTON (1963) bei einer im Prinzip ähnlichen Bestimmungsmethode die Anwesenheit eines Metaboliten sogar ablehnen.

Da die Versuchspersonen nicht gleiches Körpergewicht aufwiesen und die Dosierung wegen der vorgegebenen Dragees nicht auf dieses bezogen werden konnte, wurde von PELZER und MAASS (1969) vorgeschlagen, die Blutspiegel umzurechnen. Bei einem willkürlich angenommenen Bezugsgewicht von 70 kg müßten dann alle Blutspiegelwerte mit dem Korrekturfaktor f = Körpergewicht/Bezugsgewicht multipliziert werden.

Die in der vorgelegten Arbeit dargestellten methodischen Untersuchungen und deren Ergebnisse sollten einen beschreitbaren Weg zeigen, wie über die Pharmakokinetik weitere systematische Untersuchungen am Menschen zur Aufklärung einer möglichen Beeinträchtigung der Fahrtüchtigkeit aber auch der strafrechtlichen Verantwortlichkeit möglich sind, denn ohne die entsprechenden Blutspiegelkurven werden psychophysische Leistungsminderungen - möglicherweise auch Leistungsverbesserungen - nicht zuzuordnen sein und Anlaß zu Trugschlüssen geben. Da bekanntlich Metaboliten ein eigenes Wirkungsspektrum entwickeln können, erscheint es im Hinblick auf eine rationelle Arbeitstechnik an-

gezeigt, sowohl den unveränderten Wirkstoff als auch seine Metaboliten zu erfassen; dies um so mehr als bei der Wechselwirkung mit Alkohol zeitliche Verschiebungen des Arzneistoffmetabolismus auftreten können. Wahrscheinlich wird sich für solche Untersuchungen die Gaschromatographie besonders eignen.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde über quantitative Nachweismethoden von Chlordiazepoxid berichtet. Im weiteren wurden Blutspiegelbewegungen nach einmaliger Gabe von 30, 50 und 100mg Librium aufgezeichnet.

Auf Dünnschichtchromatogrammen konnte Chlordiazepoxid als Reinsubstanz bis zu einer untersten Nachweisgrenze von 0.1 gamma durch Fluoreszenzauslöschung nachgewiesen werden. Genauso empfindlich war der Nachweis von 2-Amino-5-chlorbenzophenon, das nach Säurehydrolyse aus Chlordiazepoxid entsteht.

Für die quantitative Bestimmung von reinem Chlordiazepoxid wurde alkalisiertes Blutserum mit destilliertem Diäthyläther extrahiert , nach Vorbehandlung des Ätherextraktes mit 1 ml 2 n Schwefelsäure reextrahiert und spektrophotometrisch gemessen. In einem weiteren Bestimmungsverfahren wurden Chlordiazepoxid und alle in Äther löslichen Metaboliten durch Säurehydrolyse in das 2-Amino-5-chlorbenzophenon überführt, diese Substanz diazotiert und nach Kupplung mit N-(1-Naphthyl)äthylendiamindihydrochlorid zu einem violetten Farbstoff spektrophotometrisch gemessen.

Die drei gewonnen Blutspiegelkurven zeigten einen raschen Anstieg und danach einen flachen Abfall, so daß selbst nach einmaliger Gabe von 30 mg Chlordiazepoxid in Form von Librium-Dragees nach 48 Stunden noch 0.23 und nach 72 Stunden noch rund 0.06 gamma/ml Serum nachweisbar waren.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1 ALGERI, E.J. and WALKER, J.T. — Paper Chromatographie for Identification of the Common Barbiturates. Amer.J.clin.Path. 22, 37 (1952)

2 BÄUMLER, J. und RIPPSTEIN, S. — Über den Nachweis von Methaminodiazepoxid (Librium) und seiner Metaboliten. Helv.chim.Acta 44, 2208-2210 (1961)

3 BEYER, K.H. — Zur Analytik von Benzophenonderivaten. Dtsch.Apoth.Ztg. 105, 1529 (1965)

4 BEYER, K.H. und SADEE, W. — Analytische Daten von vier 5-Phenyl-1,4-benzodiazepinderivaten in Monographien. Dtsch.Apoth.Ztg. 109, 312-314 (1969 a)

5 BEYER, K.H. und SADEE, W. — Spektrophotometrische Bestimmungen von 5-Phenyl-1,4-Benzodiazepinderivaten und Untersuchungen über den Metabolismus des Nitrazepams. Arzneim.Forschg. 19, 1929-1931 (1969 b)

6 BEYER, K.H. und SADEE, W. — Über den Metabolismus von 5-Phenyl-1,4-Benzodiazepinderivaten. Pharmaz.Ztg. 112, 1394-1395 (1967)

7 BURGER, E. — Die Beeinflussung der Alkoholwirkung durch Librium. Vortrag auf der Tagung der Dtsch. Ges. für Verkehrsmedizin in Bad Godesberg vom 4. bis 7.6.1962

8 BORIS, A., COSTELLO, J., GOWER, M.M. and WELSCH, J.A. — Endocrine Studies of Chlordiazepoxide. Proc.Soc.Exptl.Biol. and Med., 106, 708 (1961)

9 BRUNAUD, M., NAVARRO, J., SALLE, J. and SIOU, G. — Pharmacological, Toxicological and Teratological Studies on Dipotassium-7-chloro-3-carboxy-1,3-dihydro-2,2-dihydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepine-chloroazepate (Dipotassium Chlorazepate, 4306 CB), a New Tranquilizer. Arzneim.Forschg. 20, 123-125 (1970)

10 CARROL, M.N., JR., HOFF, E.C., KELL, J.F. Jr., and SUTER, C.G. — The Effects of Ethanol and Chlordiazepoxide in Altering Autonomic Responses Evoked by Isocortical and Paleocortical Stimulation. Biochem.Pharm. 8, 15 (1961)

11 COCHIN, J. and DALY, J.W. — The Use of Thin-layer Chromatography for the Analysis of Drugs. Identification and Isolation of Phenothiazine Tranquilizers and of Antihistaminics in Body Fluids and Tissues. J.Pharmacol.Exp.Therap. 139, 160-165 (1963)

12 COHEN, M.M. Cytogenetic Effects of Tranquilizing Drugs in Vivo and in Vitro. J.Amer.med.Ass. 207, 2425 (1969)

13 DEGKWITZ, R. Leitfaden der Psychopharmakologie. Wissenschaftl.Verl.Ges.mbH, Stuttgart (1967)

14 DITT, J. und PAUER, R. Pharmakopsychologische Untersuchungen mit 7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxyd. Arzneim.Forschg. 15, 653-657 (1965)

15 DOERFEL, K. Beurteilung von Analysenverfahren und -ergebnissen. Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg (1962)

16 EEROLA, R. und ALHA, A. Synergismus von Alkohol und Beruhigungsmitteln. Dtsch.Ztschr.f.Gerichtl.Medizin, 53, 201-210 (1963)

17 ETZLER, K., HOENLE, R., JOSWIG, E.H., KÖHLER, C. und MALLACH, H.J. Prüfung der statistischen Wechselwirkungen zwischen Äthylalkohol und Carbamazepin, Methaqualon und Nitrazepam. Arzneim.Forschg. 19, 988-995 (1969)

18	FREUDENBERG, K.	Grundriß der medizinischen Statistik. Schattauer-Verlag, Stuttgart (1962)
19	GARRONE, G. und DICK, P.	Vortrag, 6. Congreso Nacional de Neuropsiquiatria de Barcelona, 26. bis 30.4.1960
20	GLASS, F., GOSSOW, H. und MALLACH, H.J.	Beobachtungen und Untersuchungen über die gemeinsame Wirkung von Alkohol und Isonicotinsäurehydrazid. Arzneim.Forschg. 14, 1203-1208 (1964)
21	GOODMAN, L.S. and GILMAN, A.	The Pharmacological Basis of Therapeutics, 3rd Edition. The Macmillan Company, New York (1965)
22	HARRIS, T.	Methaminodiazepoxide J.Amer.med.Ass. 172, 1162-1163 (1960)
23	HÄNDEL, K.	Rechtsfragen zum Thema Arzneimittel und Verkehr. Arzneim.Forschg. 14, 915 (1964)
24	JÜNEMANN, H.J., KRÜGER, H.J. und SCHWARZ, H.	Beitrag zur klinischen Therapie mit Librium. Med.Welt 20, 1094-1100 (1961)
25	KAMM, G. und BAIER, R.	Nachweis von Chlordiazepoxid und Diazepam in kleinen Blutmengen. Arzneim.Forschg. 19, 213-215 (1969)

26 KAZYAK, L. and KNOBLOCK, E.C. — Application of Gas Chromatography to Analytical Toxicology. Analyt.Chem. 35, 1448-1452 (1963)

27 KAMM, G. und KELM, R. — Quantitativer Nachweis von 7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on im Plasma bei einmaliger und längerer Verabreichung. Arzneim.Forschg. 19, 1659-1662 (1969)

28 KIELHOLZ, P., GOLDBERG L., IM OBERSTEG, J., POELDINGER, W., RAMSEGER, A. und SCHMID, P. — Straßenverkehr, Tranqulizer und Alkohol. Dtsch.med.Wochenschr. 92, 1525-1531 (1967)

29 KIELHOLZ, P. — Der heutige Stand der ambulanten Behandlung depressiver Zustandsbilder. Münch.med.Wochenschr. 102, 2200-2205 (1960)

30 KOECHLIN, B.A. and SCHWARTZ, M.A. — The Metabolic Fate of Chlordiazepoxide. Fed.Proc. 20, 171 (1961)

31 KOECHLIN, B.A., SCHWARTZ, M.A., KROL, G. and OBERHANSLI, W. — The Metabolic Fate of C^{14}-labeled Chlordiazepoxide in Man, in the Dog and in the Rat. J.Pharm.and Exptl.Therap. 148, 399 (1965)

32 KOECHLIN, B.A. and D'ARCONTE, L.
Determination of Chlordiazepoxide (Librium) and of a Metabolite of Lactam Character in Plasma of Humans, Dogs and Rats by a Specific Spektrofluorometric Micromethod.
Analyt.Biochem. 5, 195-207 (1963)

33 KOHLER, E.
Über geeignete mikrochemische Nachweismethoden von Medazepam als Voraussetzung für pharmakokinetische Untersuchungen.
Inaugural-Diss. Tübingen, 1970

34 KOPMANN, E. and HUGKES, F.W.
Potentiating Effect of Alcohol on Tranquilizers and Other Central Depressants.
Arch.gen.Psychiat. 1, 7 (1959)

35 KRAULAND, W., WOJAHN, H., und GLASS, F.
Trinkmenge und Blutalkoholkonzentration.
In Forschungsergebnissen der Gerichtlichen Medizin (Festschrift für Herbert Elbel).
Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck (1967)

36 LEUBE, H.
Erweiterung therapeutische Möglichkeiten durch einen neuen Tranquilizer.
Arzneim.Forschg. 18, 1542-1571 (1968)

37 LIBERSON, W.T., KAFKA, A. and SCHWARTZ, E.
Effects of Chlordiazepoxide (Librium) and Other Psychopharmacological Agents on "Fixated" Behavior in Rats.
Biochem.Pharm. 8, 15 (1961)

38 MACEK, K. und VECERKOVA, J.
Neues Verfahren der systematischen Analyse von Arzneimitteln durch Papier- und Dünnschichtchromatographie.
Pharmazie 20, 605-616 (1965)

39 MALLACH, H.J.
Alkohol und Arzneimittel als verkehrsmedizinisches Problem.
Materia medica Nordmark 20, 430-436 (1968)

40 MALLACH, H.J.
Die Beeinflussung der Verkehrstüchtigkeit durch exogene Wirkstoffe.
in Gadamers Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittelung der Gifte, Göttingen, Vandenhoeck und Ruprecht (1969)

41 MUNOZ, G.
Hypnotica und Euhypnica.
Vortrag, Symposium über die Physiologie, Pharmakologie und Klinik des Schlafes, Zürich, 18./19.9.1964

42 OELSCHLÄGER, H.
Über das polarographische Verhalten des Chlordiazepoxids.
Arch.Pharm. 296, 396-403 (1963)

43 PAULUS, W., HOCH, W. und KEYMER, R. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen einiger Phenothiazine und ähnlich wirkender Stoffe. Arzneim.Forschg. 13, 609-610 (1963)

44 PELZER, H. und MAASS, D. Pharmakokinetik und Metabolismus von 7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on und dessen Hemisuccinat beim Menschen. Arzneim.Forschg. 19, 1652-1656 (1969)

45 PIRA, H. Librium in der Allgemeinpraxis. Landarzt 37, 433-434 (1961)

46 PLETSCHER, A., DA PRATA, M., and FOGLAR, G. Differences between Neuroleptics and Tranquilizers Regarding Metabolism and Biochemical Effects. Proceedings of the Vth Internat. Congress of the Collegium Internat. Neuropsychopharmacologicum. Reprinted from Excerpta Medica Intern. Congress Series No. 129 (1966)

47 PRIBILLA, O. Chlordiazepoxyd, Studien zum Nachweis der Ausscheidung beim Menschen. Arzneim.Forschg. 14, 723-733 (1964)

48 RANDALL, L.O. and KAPPEL, B. — Pharmacology of Chlordiazepoxide (Librium) and Analogs. Biochem.Pharm. 8, 15 (1961)

49 RANDALL, L.O., PH.D. — Pharmacodynamics of Chlordiazepoxide and other Benzodiazepinederivates. In Nodine, J.H., Moyer, J.H.: Psychosomatic Medicine, The first Hahnemann Symposium, 476-479, Lea and Febiger, Philadelphia (1962)

50 RANDALL, L.O. — Pharmacology of Methaminodiazepoxide. Dis.Nerv.System 21, 7 (1960)

51 RANDALL, L.O., SCHALLEK, W., HEISE, G.A., KEITH, E.F. and BAGDON, R.E. — The Psychosedative Properties of Methaminodiazepoxide. J.Pharm. and Exptl.Therap. 129, 163-171 (1960)

52 RANDALL, L.O. — Pharmacology of Chlordiazepoxide (Librium). Dis.Nerv.System 22, 1 (1961)

53 RANDALL, L.O., SCHEKKEL, C.L. and BANZIGER, R.F. — Pharmacology of the Metabolites of Chlordiazepoxide and Diazepam. Current Therapeutic Research 7, 590-606 (1965)

54 REIMER, F. — Vergleichende Untersuchungen über das Wirkungsprofil einiger Benzodiazepinderivate. Arzneim.Forschg. 18, 1568 (1968)

55 V. RECHENBERG, H.K. und SPIEGELBERG, H.L. — Behandlung des degenerativen Rheumatismus mit Librium (Roche). Schweiz.med.Wochenschr. 90, 1121-1124 (1960)

56 RIEDER, J. und RENTSCH, G. — Metabolismus und Pharmakokinetik des neuen Psychopharmakons 7-Chlor-2,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin (Ro 5-4556) beim Menschen. Arzneim.Forschg. 18, 1546-1563 (1968)

57 SCHALLEK, W. and KUEHN, A. — Effects of Psychotropic Drugs on Limbic System of Cat. Proc.soc.Exptl.Biol.and Med. 105, 11-117 (1960)

58 DE SILVA, J.A.F., SCHWARTZ, M.A., STEFANOVIC, V., KAPLAN, J. and D'ARCONTE, L. — Determination of Diazepam (Valium) in Blood by Gas Liquid Chromatography. Anal.Chem. 36, 2099-2105 (1964)

59 SMYTH, D. and PENNINGTON, G.W. — The Detection and Excretion of Chlordiazepoxide (Librium) in Human Plasma and Urine. Arch.int.Pharmacodyn 145, 154-165 (1963)

60 SMYTH, D., PENNINGTON, G.W. and JACKSON, N. — Identification Reactions of Chlordiazepoxide (Librium) and the Product of Acid Hydrolysis 2-Amino-4-chlorobenzophenone. Arch.int.Pharmacodyn 145, 147-153 (1963)

61 SPARWASSER, H. — Erfahrungen mit Librium bei urologischen Patienten. Med.Welt 38, 2002-2005 (1962)

62 STERNBACH, L.H. and REDDER, E. — Quinazolines and 1,4-Benzodiazepines. IV. Transformations of 7-Chloro-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepine-4-oxide. J.org.Chem. (USA) 26, 4936-4941 (1961)

63 STERNBACH, L.H., RANDALL, L.O. and GUSTAFSON, S.R. — 1,4-Benzodiazepines (Chlordiazepoxide and Related Compounds). in Gordon M.: Psychopharmacological Agents. Academ.Press 1, 137 pp (1964)

64 TAUBER, C.G. — Librium, ein neues psychotropes Pharmakon. Erste Erfahrungen in Klinik und ambulanter Praxis. Schweiz.Med.Wochenschr. 90, 1065-1070 (1960)

65 THOMPSON, H.L. and DECKER, W.J. — Librium 2840, Valium 2015 and different other Psychosedative, Psychostimulant, Sedative etc., Qualitative and Quantitative Determination in Blood by new Simplified Gaschromatography-technique Human. Am.J.Clin.Pathol. 49, 103-107 (1968)

66 TOBIN, J.M., BIRD, J.F. and BOYLE, D.E. Preliminary Evaluation of Librium (Ro 5-0690) in the Treatment of Anxiety Reactions. Dis.Nerv.System 21, 11-19 (1960)

67 VIDIC, E. Papierchromatographische und spektralphotometrische Identifizierung barbitursäurefreier Sedativa, insbesondere von Meprobamat. Arch.Toxikol. 17, 373 (1959)

68 VIGNOLI, L. and CANO, J.P. Librium 2081, Valium 1135, Mogadan 168 Psychosedative Benzodiazepine, Separation and Identification by Gaschromatography of the Hydrolysis-product. Bull.Soc.Chim.France 5, 1528 pp (1966)

69 WAGNER, H.J. Vergleichende Untersuchungen über die zahlenmäßigen Beziehungen zwischen medikament- bzw. alkoholbeeinflussten Verkehrsteilnehmern. Zentralblatt Verkehrsmed. 9, 132-135 (1963)

70 WALSEN, O. Klinische Untersuchungen über Librium in der Geburtshilfe und Frauenheilkunde. Med. Welt 27, 1444-1445 (1961)

71 WANDREY, D. und LEUTNER, V. — Neuro-Psychopharmaka in Klinik und Praxis. F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart, 2. Aufl. 1967

72 WREDE, J. — Beitrag zur medikamentösen Behandlung von Angst- und Zwangsvorstellungen. Therap.d.Gegenwart 100, 568-570 (1961)

73 WYSS, S. und MAIER, C. — Erfahrungen mit dem neuen Psychosedativum Librium (Ro 5-0690) bei einem internistischen Krankengut. Schweiz.Med.Wochenschr. 90, 1293-1296 (1960)

Lebenslauf

Am 1. Juni 1943 wurde ich, Siegfried Henzler, als Sohn des Erwin Henzler und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Dieterich, in Tübingen geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule und des Gymnasiums in Metzingen legte ich 1963 das Abitur ab. Im gleichen Jahr begann ich das Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen. Nach dem Physikum studierte ich im Sommersemester 1966 an der Universität Kiel und im Wintersemester 1966/67 an der Universität Wien. Am 29. August 1969 bestand ich in Tübingen das medizinische Staatsexamen.

Vom 1. September 1969 bis zum 28. Februar 1970 war ich am Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen als Medizinalassistent tätig.